

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E  
PARASITOLOGIA**

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DA ENZIMA  
TRIPANOTIONA REDUTASE DE *LEISHMANIA*  
*BRAZILIENSIS* E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE  
CHALCONAS**

**REBECA KÖRTING NUNES**

**FLORIANÓPOLIS  
2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E  
PARASITOLOGIA**

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DA ENZIMA  
TRIPANOTIONA REDUTASE DE *LEISHMANIA*  
*BRAZILIENSIS* E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE  
CHALCONAS**

**REBECA KÖRTING NUNES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

**FLORIANÓPOLIS  
2011**




"Clonagem e expressão da enzima tripanotona redutase de *Leishmania braziliensis* e atividade leishmanicida de chalconas." POR

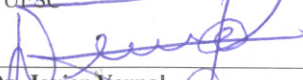
**REBECA KÖRTING NUNES**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Comissão Examinadora.

Orientador:


  
Prof. Dr. Mário Steindel  
MIP/CCB/UFSC

Comissão Examinadora:

  
Dr. Javier Vernal  
BQA/CCB/UFSC

  
Prof. Dr. Ricardo Andrade Rebelo  
FURB

  
Prof. Dr. Adair Roberto Santos  
CFS/CCB/UFSC

  
Prof.ª. Dr.ª. Cláudia Maria Oliveira Simões – CIF/CCS/UFSC  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências/CCB/UFSC  
Florianópolis, Março de 2011.



## RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar atividade leishmanicida *in vitro* de chalconas trimetoxiladas contra formas promastigotas de cultura e amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e *L. chagasi* em células da linhagem J744-A1 e macrófagos murinos derivados de medula. Além disso, foi realizada a clonagem e a expressão da enzima tripanotiona redutase de *L. braziliensis* com o objetivo de implementar uma metodologia para avaliação de compostos inibidores desta enzima. Trinta e cinco das 70 chalconas avaliadas mostraram atividade leishmanicida contra formas promastigotas, com  $CI_{50}$  variando de 1,31 a 32,54  $\mu M$ , e oito destas mostraram índices de seletividade maiores que 20 contra formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. chagasi*. Nos ensaios contra formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* na linhagem J744-A1, as chalconas M10 e M30 apresentaram  $CI_{50}$  de 0,13 e 0,34  $\mu M$ , respectivamente, sendo as mais seletivas para o parasito. Em macrófagos murinos infectados a  $CI_{50}$  variou de 2,2 a 6,5  $\mu M$  para *L. braziliensis* e de 2,4 a 8,7  $\mu M$  para *L. chagasi*. De maneira geral, a espécie dermatrópica mostrou-se mais sensível que a viscerotrópica aos compostos. A expressão da tripanotiona redutase recombinante de *L. braziliensis* (LbTR) resultou em uma proteína de 53,5kDa. A atividade biológica da enzima foi confirmada pela redução do substrato (tripanotiona) e sua inibição pelos compostos padrão (clomipramina e ácido gálico). Ensaios de inibição *in vitro* da atividade enzimática com as 8 chalconas ativas mostraram que apenas dois compostos (D08 e M17) foram capazes de inibir moderadamente a atividade da enzima (58% e 63%). As chalconas trimetoxiladas apresentaram

um potente efeito leishmanicida in vitro, constituindo-se em moléculas protótipo promissoras para o desenvolvimento de novos agentes leishmanicidas.

Palavras-chave: leishmaniose, chalcona, tripanotiona redutase, atividade leishmanicida



“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marco Antonio e Mirtes, por todo apoio e incentivo que sempre demonstraram por meus estudos;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mário Steindel, pela orientação, confiança e exemplo;

À CAPES, pelo financiamento do projeto;

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, pelos conhecimentos e experiências trocados;

Aos técnicos do Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia (LAMEB), Bibiana e Denis, pela disponibilidade e atenção;

Aos colegas do Laboratório de Protozoologia, atuais e antigos, que, ao longo dos seis anos em que participo deste grupo de pesquisa compartilharam conhecimentos e experiências científicas – ou não! - , tornando-se mais do que colegas de trabalhos, e sim verdadeiros amigos;

Aos colegas do LIA, LVA e LIDI, que compartilharam corredores, equipamentos, risadas e choros e tornaram o cotidiano no laboratório produtivo e divertido;

Às meninas da Proto que puseram a ‘mão na massa’, emprestaram seus conhecimentos e tempo para complementar este trabalho, de forma bem humorada e atenciosa: Patrícia, Aline, Celina e Iriane;

Às pessoas surpreendentes que encontrei em meu caminho durante este período e que tornaram a rotina mais agradável: João Marcelo, Elis Maria, Ana Carolina, Marciano, Sara, Tiago, Amanda, Rodrigo (Narigueto), Rodrigo (Doug), Samira, Klay, Natalie;

Aos queridos amigos Ariane, Aurélio, Anderson, Paola, Elisa Carolina, Karime, Gustavo e Thais, que, apesar de meu afastamento, permaneceram ao meu lado, com preocupação e apoio;

Ao Jadir, que cruzou meu caminho no decorrer do ano passado e me proporcionou momentos únicos e a companhia de pessoas especiais, como Elaine, Eduardo e Bruno;

A todos aqueles que, de forma direta ou indireta, colaboraram para a realização deste trabalho.

Rebeca Körting Nunes  
Florianópolis, 2011.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABS/T: absorbancia/ tempo  
ADP: adenosine di-fosfato  
AIDS: Síndrome da imunodeficiência humana  
ATP: adenosine tri-fosfato  
AMP: ampicilina  
ANF: anfotericina  
°C: graus célsios  
CI<sub>50</sub>: concentração inibitória de 50%  
CC<sub>50</sub>: concentração citotóxica de 50%  
DEPC: Diethylpirocarbonato  
DMC: 2,4-dihidroxi-6-metoxi-chalcona  
DMEN: Dubelcco's Modified Eagle Medium  
DNA: ácido desoxirribonucleico  
dNTP: desorribonuleotídeo trifosfatado  
EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid  
DMSO: dimetilsulfóxido  
GSH: glutationa  
GSSG: glutationa dissulfeto  
GR: glutationa redutase  
h: horas  
HIV: vírus da imunodeficiência humana  
INF: interferon  
IPTG: Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside  
IS: índice de seletividade  
kDa: quilodalton  
K-DNA: ácido desoxirribonucléico do cinetoplasto  
Kg: kilograma  
kV: quilowatts

Lb: *Leishmania braziliensis*  
LB: meio Luria Bertani  
LbTR: tripanotona redutase de *L. braziliensis*  
Lc: *Leishmania chagasi*  
LC: leishmaniose cutânea  
LCM: leishmaniose cutâneo-mucosa  
LDC: leishmaniose difusa cutânea  
LTA: leishmaniose tegumentar Americana  
LV: leishmaniose visceral  
min: minuto  
mL: mililitro  
mm: milímetro  
MTT: trimetil tetrazolio  
µg: micrograma  
µL: microlitro  
µM: micromolar  
NADH: dicotinamida adenine dinucleotideo reduzida  
NADPH: dicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzida  
nm: nanômetro  
OD: densidade optica  
PAGE: gel de poliacrilamida  
pb: pares de base  
PBS: Tampão salina fosfato  
PCR: reação em cadeia da polimerase  
pH: potencial hidrogeniônico  
PKCL: Leishmaniose cutânea pós-calazar (post-kalazar cutaneous leishmaniasis)  
RFLP: Restriction fragment length polymorphism  
s: segundo  
SBF: soro bovino fetal  
SbV: antimonial pentavalente

SDS: sodio dodecil sulfato

TBE: tampão tris/borato/edta TR: tripanotona redutase

TR: tripanotona redutase

T(S)<sub>2</sub>: tripanotona

UV: ultravioleta

V/V: volume/volume

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i> . ....	3
Figura 2: Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp .....	5
Figura 3: Estrutura e função enzimática da tripanotona redutase. A) Comparação entre as estruturas da glutatona e tripanotona, substratos da GR e TR, respectivamente; B) Cascata de eventos dependentes da TR responsáveis pela neutralização das espécies reativas de oxigênio.....	9
Figura 4: Estrutura básica de chalconas contendo substituintes (AX e BY).....	9
Figura 5: Estrutura básica das chalconas das séries D, M e J. a) chalcona da série D, onde R representa o radical variável da série; b) chalcona da série M onde R representa o radical variável da série; c) chalcona da série J, onde R representa o radical variável da série.....	13
Figura 6: Mapa do plasmídio pGEM-T easy vector. A seta externa ao plasmídio indica o local de inserção do gene clonado, dividindo o gene da galactosidase, <i>ori</i> indica a origem da transcrição e a região Amp indica a região do gene de resistência à ampicilina.....	
Figura 7: Mapa do plasmídio pET14b vector. A seta externa ao plasmídio indica o local de inserção do gene clonado, dividindo o gene da galactosidase, <i>ori</i> indica a origem da transcrição e a	



região Amp indica a região do gene de resistência à ampicilina.....

Figura 8: Avaliação da atividade leishmanicida das chalconas contra formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e *L. chagasi* em macrófagos murinos derivados de medula óssea. Os resultados foram obtidos pela contagem de amastigotas intracelulares em 500 células infectadas, representado a média de três experimentos independentes, realizados em triplicata, com intervalo de confiança de 95%.....46

Figura 9: Resultados representativos da avaliação microscópica de macrófagos murinos infectadas com *L. braziliensis* coradas pelo Giemsa após 48 horas de infecção: (A) Controle negativo sem composto leishmanicida e presença de 1% DMSO; (B) Controle positivo tratamento com Anfotericina B na concentração de 1µM; (C) Tratamento com M10 na concentração de 10µM; (D) Tratamento com M30 na concentração de 100µM. As setas pretas apontam os amastigotas dentro dos vacúolos parasitóforos; as setas vermelhas apontam os vacúolos parasitóforos vazios. A barra representa 10µm.....47

Figura 10: Resultados representativos da avaliação microscópica de macrófagos murinos infectadas com *L. chagasi* coradas pelo Giemsa após 48 horas de infecção: (A) Controle negativo sem composto leishmanicida e presença de 1% DMSO; (B) Controle positivo tratamento com Anfotericina B na concentração de 1µM; (C) Tratamento com M10 na concentração de 10µM; (D) Tratamento com M30 na concentração de 100µM. As setas pretas apontam os amastigotas dentro dos vacúolos

parasitóforos; as setas vermelhas apontam os vacúolos parasitóforos vazios. A barra representa 10µm.....48

Figura 11: Perfil de PCR-RFLP de cepas de *Leishmania* sp. com as enzimas de restrição *Ava*I (A) e *Hae*III (B). As canaletas correspondem: 1. marcador de peso molecular (fago lambda digerido com *Eco*RI); 2. *L. amazonensis* cepa 575; 3. *L. braziliensis* cepa L2904; 4. *L. braziliensis* cepa H3; 5. Controle negativo .....49

Figura 12: Eletroforese em gel de agarose a 1%, corado por brometo de etídeo, revelando o produto de amplificação de 1550pb em um gradiente de 55° C a 65° C para ligação dos iniciadores. 1. Padrão de peso molecular (Fago lambda digerido com *Hind*III); 2. TA 55° C; 3. TA 57° C; 4. TA 59° C; 5. TA 61° C; 6. TA 63° C; 7. TA 65° C; 8. Controle negativo.....50

Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo revelando o produto de amplificação de 1550pb do gene da *Lb*TR em diferentes condições salinas. 1. Padrão de peso molecular (fago lambda digerido com *Hind*III); 2. Tampão 1 (pH6.8, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl); 3. Tampão 2 (pH6.8, 3.5mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl); 4. Tampão 3 (pH6.8, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl); 5. Tampão 4 (pH6.8, 3.5mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl); 6. Tampão 5 (pH8.8, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl); 7. Tampão 6 (pH8.8, 3.5mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl); 8. Tampão 7 (pH6.8, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl); 9. Tampão 8 (pH6.8, 3.5mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl); 10. Tampão 9 (pH9.2, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl); 11. Tampão 10 (pH9.2, 3.5mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl); 12. Tampão 11(pH9.2, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl); 13. Tampão 12 (pH9.2, 3.5mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM

KCl); 14. Controle positivo, tampão 10X Taq polimerase Promega e 1.5mM KCl; 15. Controle negativo.....51

Figura 14: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado por brometo de etídeo revelando o produto de amplificação de 1550pb. 1. marcador de peso molecular (fago lambda digerido com *HindIII*); 2: amostra; 3. controle.....52

Figura 15: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado por brometo de etídeo revelando o produto de amplificação de 1550pb das colônias bacterianas positivas para o inserto do fragmento de DNA do gene da *LbTR* no plasmídio pGEM-T easy. 1. Marcador de peso molecular (fago lambda digerido com *HindIII*; 2 a 16. Amostras; 17. Controle negativo .....53

Figura 16: Alinhamento da estrutura primária da *LbTR* com as sequências aminoacídicas de tripanotiona redutase de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *T. cruzi*, depositadas no GenBank. LBH3: cepa H3 de *L. braziliensis*; LB: sequência de aminoácidos da tripanotiona redutase de *L. braziliensis* (número de acesso: [XP\\_001561849.1](#)); LA: sequência de aminoácidos da tripanotiona redutase de *L. amazonensis* (número de acesso: EF583873); TC: sequência de aminoácidos da tripanotiona redutase de *Trypanosoma cruzi* (número de acesso: M38051.1). Os asteriscos representam aminoácidos idênticos, e os pontos simples e duplos representam aminoácidos diferentes nas sequencias preditas.....54

Figura 17: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado por brometo de etídeo revelando o produto de amplificação de 1550pb das colônias bacterianas positivas para o inserto do fragmento de DNA do gene da *LbTR* no plasmídio pET14b. 1.

Marcador de peso molecular (fago lambda digerido com *Hind*III; 2 a 9. Amostras; 10. Controle negativo.....56

Figura 18: Teste de indução heteróloga da proteína recombinante *LbTR*. A. Gel de poliacrilamida desnaturante a 12%; B. Western Blot anti-cauda de histidina. 1. Marcador de tamanho molecular (*BenchMark™ Protein Ladder*, Invitrogen); 2. Fração solúvel do lisado da cultura crescida 15°C/6h; 3. Fração insolúvel do lisado da cultura crescida a 15°C/6h; 4. Fração solúvel do lisado da cultura crescida 15°C/12h; 5. Fração insolúvel do lisado da cultura crescida a 15°C/12h; 6. Fração solúvel do lisado da cultura crescida 27°C/3h; 7. Fração insolúvel do lisado da cultura crescida a 27°C/3h; 8. Fração solúvel do lisado da cultura crescida 27°C/6h; 9. Fração insolúvel do lisado da cultura crescida a 27°C/6h; 10. Fração solúvel do lisado da cultura crescida 27°C/12h; 11. Fração insolúvel do lisado da cultura crescida a 27°C/12h; 12. Fração solúvel do lisado da cultura crescida 37°C/3h; 13. Fração insolúvel do lisado da cultura crescida a 37°C/3h; 14. Fração solúvel do lisado da cultura crescida 37°C/6h; 15. Fração insolúvel do lisado da cultura crescida a 37°C/6h; 16. Controle negativo.....58

Figura 19: Análise da expressão heteróloga da proteína recombinante *LbTR* através de gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 12%, corado com Comassie Blue 250. 1. Padrão de Tamanho Molecular (*BenchMark™ Protein Ladder*, Invitrogen); 2. Fração solúvel após 6 horas da indução a 27°C; 3. Fração insolúvel após 6 horas da indução a 27°C; 4 a 6. Lavagens da coluna com tampão; 7 a 10. Eluatos da proteína com tampão de imidazol (proteína purificada).....59

Figura 20: Teste de atividade da *Lb*TR após a purificação e padronização da concentração enzimática para os ensaios de inibição. Os resultados representam a média de três experimentos independentes, realizados em triplicata.....60

Figura 21: Efeito inibitório da *Lb*TR por chalconas. Todos os compostos foram utilizados a 100µM. Os inibidores utilizados foram a clomipramina (CLO) (6,5 µM) e o ácido gálico (AG) (100µM). Os resultados foram expressos em percentual de atividade enzimática após incubação com os compostos. Os resultados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em triplicata.....61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios de atividade leishmanicida (CI<sub>50</sub>) para promastigotas de *L. braziliensis* e citotoxicidade (CC<sub>50</sub>) para a linhagem celular J774.A1 de chalconas.....37

Tabela 2: Citotoxicidade frente à linhagem celular J774.A1 (CC<sub>50</sub>), atividade leishmanicida *in vitro* contra formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. chagasi* (CI<sub>50</sub>) e índice de seletividade (IS) de chalconas .....39

Tabela 3: Número de parasitos, porcentagem de amastigotas e de parasitos viáveis após 48 horas de diferenciação a 37° C de promastigotas de fase exponencial tardia de *L. chagasi* em cinco condições de pH, a partir de um inóculo de 80x10<sup>6</sup> parasitos/ml.....41

Tabela 4: Citotoxicidade frente à linhagem celular J774.A1 (CC<sub>50</sub>), atividade leishmanicida *in vitro* contra formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e *L. chagasi* (CI<sub>50</sub>) e índice de seletividade (IS) de chalconas.....43

Tabela 5: Citotoxicidade frente à macrófagos de medula murinos (CC<sub>50</sub>), atividade leishmanicida *in vitro* contra formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e *L. chagasi* (CI<sub>50</sub>) e índice de seletividade (IS) de chalconas.....44

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1	Leishmanioses.....	3
2.2	Tripanotoma reducta.....	10
2.3	Chalconas.....	14
3.	OBJETIVOS.....	18
3.1	Objetivo geral.....	18
3.2	Objetivo específico .....	18
4.	METODOLOGIA.....	19
4.1	Chalconas .....	19
4.2	Parasitos.....	20
4.3	Bioensaios.....	21
4.3.1	Avaliação da atividade de chalconas contra formas promastigotas de <i>Leishmania</i> .....	21
4.3.2	Determinação da citotoxicidade pela técnica colorimétrica do MTT.....	22
4.3.3	Padronização da amastigogênese de <i>Leishmania chagasi</i> .....	23
4.3.4	Avaliação da atividade das chalconas contra formas amastigotas intracelulares de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. chagasi</i> .....	24
4.3.5	Avaliação da citotoxicidade e atividade contra formas amastigotas de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. chagasi</i> em macrófagos murinos .....	25
4.3.6	Avaliação da produção de NO em macrófagos expostos as chalconas .....	26

4.4	Clonagem da Tripanotiona Redutase de <i>Leishmania braziliensis</i> .....	26
4.4.1	Extração do DNA de <i>L. braziliensis</i> .....	26
4.4.2	Amplificação do gene de tripanotona redutase (TR) de <i>L. braziliensis</i> .....	27
4.4.3	Purificação e clonagem do gene da TR.....	28
4.4.4	Sequenciamento do DNA.....	30
4.4.5	Expressão e purificação da tripanotiona redutase recombinante de <i>Leishmania braziliensis</i> (LbTR).....	31
4.4.6	Avaliação da atividade da LbTR e inibição da enzima por chalconas.....	34
5.	RESULTADOS .....	36
5.1	Bioensaios.....	36
5.1.1	Avaliação da atividade leishmanicida de chalconas contra formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. chagasi</i> e citotoxicidade em células J774-A1.....	36
5.1.2	Padronização da amastigogênese de <i>L. chagasi</i> .....	40
5.1.3	Avaliação da atividade leishmanicida de chalconas contra formas amastigotas de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. chagasi</i> e citotoxicidade em células J774-A1 e macrófagos murinos derivados de medula óssea.....	41
5.2	Clonagem da Tripanotiona Redutase de <i>Leishmania braziliensis</i> (LbTR).....	49
5.2.1	Obtenção da sequência.....	49
5.2.2	Expressão, purificação e avaliação da atividade enzimática de LbTR e do efeito inibitório das chalconas.....	56
6.	DISCUSSÃO.....	62



7.	CONCLUSÕES.....	73
8.	REFERÊNCIAS.....	74
APÊNDICE 1: CHALCONAS D: DERIVADAS DAS 2,4,5 - TRIMETOXIBENZALDEÍDO.....		89
APÊNDICE 2: CHALCONAS J: DERIVADAS DA 2,4,5- TRIMETOXIACETOFENONA.....		92
APÊNDICE 3: CHALCONAS M: DERIVADAS DA 3,4,5- TRIMETOXIACETOFENONA.....		99



## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecto parasitárias endêmicas em 88 países de quatro continentes onde afetam cerca de 12 milhões de indivíduos, ocasionado aproximadamente 2 milhões de casos novos por ano com 70 mil mortes anuais (WHO, 2010). A doença apresenta uma forte associação com a pobreza visto que mais de 80% dos portadores de leishmanioses recebem menos de dois dólares por dia (DAVIES *et al.*, 2003).

O Brasil faz parte do grupo de nove países em que se encontram 90% dos casos registrados de leishmaniose tegumentar e visceral, ao lado de Irã, Arábia Saudita, Síria, Afeganistão, Peru, Índia, Bangladesh e Nepal (GONTIJO e DE CARVALHO, 2003; MISHRA *et al.*, 2009).

Como não existe disponível nenhuma vacina eficaz contra protozoários parasitos, o uso dos poucos quimioterápicos existentes é uma das únicas alternativas para o tratamento dos indivíduos infectados (BRENER, 2000). Os diversos efeitos colaterais e a resistência aos fármacos existentes, bem como o aumento de novos casos e a expansão geográfica da endemia têm despertado para a urgência na busca por novos agentes terapêuticos para tratar essas doenças (MESQUITA *et al.*, 2007). As chalconas são um grupo de compostos químicos de ocorrência natural que possuem diferentes bioatividades entre as quais se destacam a atividade anticancerígena, antiviral, inseticida, antiinflamatória, antiparasitária entre outras (TORRES-SANTOS *et al.*, 1999). Estudos de atividade antiparasitária deste grupo de compostos demonstram resultados promissores tanto em testes *in vitro* como *in vivo* (LUNARDI *et al.*, 2003; BOECK *et al.*, 2006; ANDRIGHETTI-FÖHNER *et al.*, 2008).

Considerando que 90% dos casos de LTA no Brasil são devidos à *Leishmania braziliensis* (SALAY *et al.*, 2004), esforços necessitam ser envidados para compreender a genética, o metabolismo e a susceptibilidade deste parasito a novos fármacos.

A tripanotiona redutase, enzima exclusiva dos tripanossomatídeos e de necessidade vital para os mesmos, é preconizada como um alvo terapêutico eficaz e seguro. Desta forma, a clonagem e expressão desta enzima apresenta relevância do ponto de vista farmacêutico e biotecnológico, uma vez que este modelo poderá ser de grande aplicabilidade prática para a busca de substâncias que possam apresentar ação inibitória específica da tripanotiona redutase de *L. braziliensis* e desta forma, constituírem-se em substâncias potenciais para a continuidade dos estudos em modelos experimentais *in vivo*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças polimórficas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Kinetoplastidae: Trypanosomatidae). Atualmente são aceitas 16 diferentes espécies agrupadas em oito complexos e dois subgêneros (*Leishmania* e *Viannia*) (Figura 1) (MISHRA *et al.*, 2009). A doença afeta cerca de 12 milhões de pessoas em regiões tropicais e subtropicais, onde estima-se que cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de transmissão da parasitose (WHO, 2010).

Dos casos registrados de leishmaniose, 90% dos casos da forma tegumentar ocorreram no Irã, Arábia Saudita, Síria e Afeganistão (Velho Mundo), Brasil e Peru, na América do Sul (GONTIJO e DE CARVALHO, 2003), enquanto que 90% dos casos da forma visceral ocorreram na Índia, Nepal, Bangladesh e Brasil (MISHRA *et al.*, 2009). Apesar do grande problema de saúde pública mundial, principalmente nos países em desenvolvimento, as leishmanioses constam da relação das chamadas *doenças negligenciadas* (MISHRA *et al.*, 2009).

As leishmanioses acompanham as civilizações humanas há muitos séculos. Porém, a descoberta de seus agentes etiológicos só ocorreu no final do século XIX, quando Cunningham em 1885 descreveu formas amastigotas em casos de calazar, na Índia, e o pesquisador russo Borovisky demonstrou ser um protozoário o agente etiológico do Botão do Oriente. Em 1903, Leishman e Donovan realizaram as primeiras descrições do protozoário responsável pelo Calazar indiano, denominado mais tarde de *Leishmania donovani*. Neste mesmo ano, Wright descreveu o parasito do Botão do Oriente,

conhecido atualmente como *Leishmania tropica* (RATH *et al.*, 2003, LAISON, 2010). Nas Américas, cerâmicas pré-colombianas mostravam mutilações nos lábios e nariz, características da espúndia (BASANO e CAMARGO, 2004). As lesões de pele receberam diferentes denominações (úlcer de Baurú, ferida brava e uta) dependendo da região geográfica.

As leishmanias são protozoários heteroxenos, que requerem essencialmente dois hospedeiros para completar seu ciclo biológico: um vetor invertebrado, fêmeas de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* no velho mundo ou do gênero *Lutzomyia* no novo mundo, e um hospedeiro definitivo, que compreende uma variedade de mamíferos domésticos e silvestres, incluindo o homem (MISHRA *et al.*, 2009). O ciclo biológico da *Leishmania* está representado na figura 2.

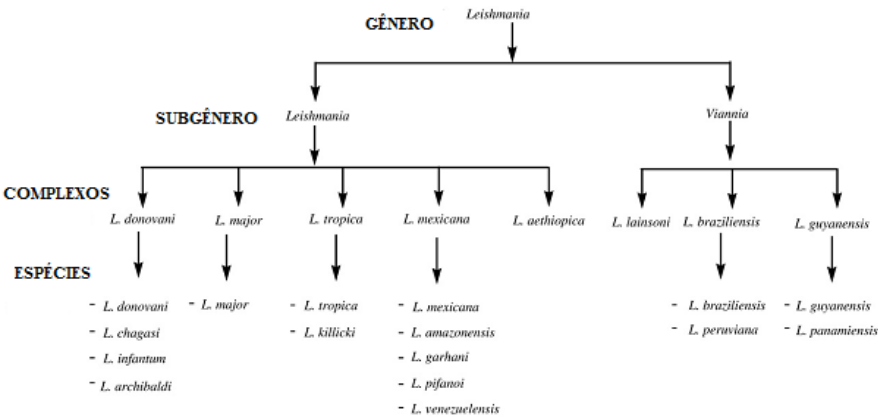


Figura 1: Taxonomia do gênero *Leishmania*.  
Fonte: MISHRA *et al.*, 2009.

Durante o repasto sanguíneo em um mamífero infectado, as fêmeas de flebotomíneos ingerem formas amastigotas, as quais são envolvidas por uma membrana quitinosa a membrana peritrófica do intestino do inseto (MICHALICK, 2005). O desenvolvimento dos parasitos no intestino do inseto depende da espécie de *Leishmania*. O complexo *L. braziliensis*, que compreende os parasitos humanos *L. braziliensis* Vianna 1911, *L. peruviana* Velez 1913, *L. guyanensis* Flock 1954 e *L. panamensis* Laison e Shaw 1972, desenvolve-se em toda a extensão do intestino do inseto, enquanto que os complexos *L. donovani*, *L. mexicana*, *L. hertini* e *L. tropica* têm seu desenvolvimento restrito às partes média e anteriores do intestino do inseto (LAISON, 2010). No interior do intestino do flebotomíneo, os parasitos se transformam em flagelados pequenos, ovóides e pouco móveis, com alta taxa de multiplicação. Após alguns dias, evoluem para formas promastigotas delgadas e longas, que rompem a matriz peritrófica, se fixam às vilosidades intestinais do inseto e migram para as porções anteriores do tubo digestivo, enquanto se transformam em promastigotas metacíclicos (MICHALICK, 2005).

Os hospedeiros vertebrados são infectados quando formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas pela fêmea do flebotomíneo durante o repasto sanguíneo. Os parasitos são internalizados através de endocitose mediada por receptores na superfície do macrófago (MICHALICK, 2005). Dentro dos fagolisossomos dos macrófagos residentes, os promastigotas sobreviventes transformam-se e replicam-se como amastigotas, os quais infectam macrófagos adicionais tanto locais quanto de tecidos distantes após a disseminação. Em pacientes suscetíveis, a inflamação local ou sistêmica se desenvolve e, dependendo da

resposta imune do hospedeiro, a doença clínica se estabelece ou não. Cerca de 10 a 15% dos pacientes que desenvolvem a doença clínica podem evoluir para cura espontânea da úlcera em um período de 6 meses a 1 ano, e nos demais, as lesões podem perdurar por longos períodos (MURRAY *et al.*, 2005).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), apresenta três formas clínicas: cutânea e cutaneomucosa e difusa. A leishmaniose cutânea (LC) caracteriza-se pela presença de úlceras únicas ou múltiplas confinadas na derme, caracterizadas pelos bordos elevados e o fundo granuloso, sendo, em geral, indolor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

A leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) está associada à *L. braziliensis* ocorrendo em um intervalo de tempo variável após a instalação da lesão cutânea inicial. Esta espécie de *Leishmania* caracteriza-se por causar um nódulo pequeno que demora muitos meses para se desenvolver e contém poucos amastigotas relativamente pequenos (LAINSON, 2010). Os fatores que contribuem para que uma doença inicialmente cutânea evolua para essa forma tardia não são de todo conhecidos, mas sabe-se que a demora na cicatrização da lesão primária e tratamento inicial inadequado podem estar associados (GONTIJO e DE CARVALHO, 2003). Entre as formas menos comuns de LTA encontra-se a leishmaniose cutânea difusa (LCD) associada a *L. amazonensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007), uma infecção bastante desfigurativa produzida em indivíduos imunologicamente incompetentes e resistentes aos tratamentos usuais com fármacos antileishmania (LAINSON, 2010).

Outra apresentação clínica da leishmaniose é a Leishmaniose Visceral (LV) ou Calazar. Esta forma da doença compromete o fígado, o baço e a medula óssea, determinando



quadros graves de hepatomegalia, esplenomegalia e pode ser causada pela *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi* (CROFT *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2008).

A pandemia de HIV/AIDS modificou a história natural das leishmanioses. A infecção por HIV aumenta o risco de desenvolver leishmaniose visceral de 100 a 2320 vezes em áreas endêmicas, reduzindo a probabilidade de sucesso da resposta terapêutica e aumentando o risco de recaída; ao mesmo tempo, a leishmaniose visceral promove a progressão clínica do HIV e o desenvolvimento das condições definidas de AIDS (ALVAR *et al.*, 2008). Ambas as doenças exercem um efeito deteriorante sinérgico da resposta imune celular, uma vez que seus alvos são células do sistema imune semelhantes (ALVAR *et al.*, 2008). Amastigotas circulantes na leishmaniose visceral ativa e parasitemia sanguínea são sintomas frequentes em pacientes imunodeficientes com calazar associado a HIV. Paradoxalmente, entretanto, parasitemia assintomática também ocorre em indivíduos imunocompetentes com infecção visceral subclínica (MURRAY *et al.*, 2005).

O curso clínico da co-infecção leishmaniose cutânea/HIV é caracterizada por apresentações atípicas, usualmente com formas graves ou incomuns. Considerando que a infecção por HIV promove uma resposta imune Th2, a depleção de células CD4+ e a redução da produção de INF, a coinfeção LC-HIV é prejudicial à cura da infecção por *Leishmania* sp., devido a capacidade debilitada dos macrófagos matarem os amastigotas (ALVAR *et al.*, 2008). Em pacientes coinfectados, foi encontrada uma variedade de lesões, incluindo pápulas, nódulos, placas e diversas ulcerações, além de diferentes formas de lesões mucosas (LINDOSO *et al.*, 2009; GOTO *et al.*, 2010). Há ainda casos de PKCL, que se

desenvolve em pacientes coinfectados com LV-HIV e que responderam ao tratamento, caracterizada por lesões máculo-papulares ou nodulares no rosto e tronco, com grave infiltração de plasma e linfócitos (ALVAR *et al.*, 2008).

No Brasil observa-se um crescimento alarmante dos casos de LV e LTA nos últimos 20 anos. Na década de 1980, a LTA autóctone já era registrada em dezenove estados do país, enquanto que no ano de 2003, todos os estados brasileiros apresentaram transmissão autóctone, demonstrando a contínua expansão geográfica da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Entre o período de 2001 a 2007, 185.037 casos de LTA foram notificados no Brasil. Atualmente, 40% dos casos registrados são da região Norte, 31% da região Nordeste, 16% da região Centro-Oeste, 10% da região Sudeste e 3% da região Sul (SINAN, 2010).

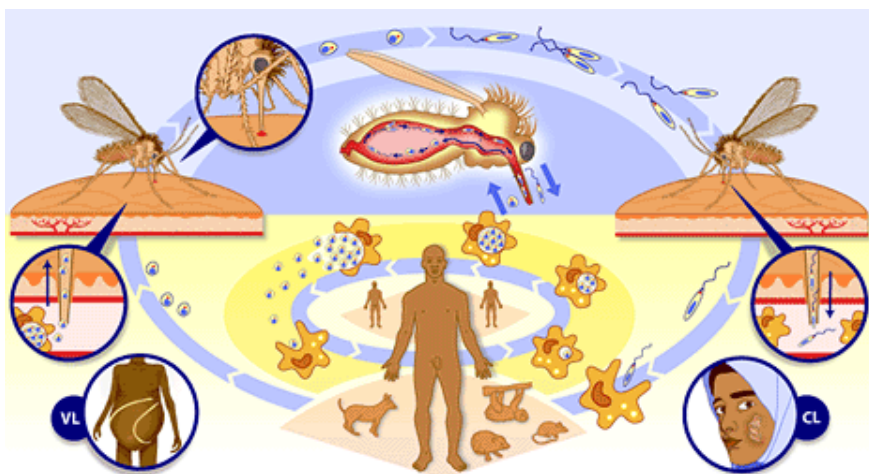


Figura 2: Ciclo biológico da *Leishmania* spp.

Fonte: WHO, 2004.

Segundo o Ministério da Saúde, cerca de 40 mil novos casos de LTA são registrados anualmente no Brasil. Além de uma cadeia epidemiológica complexa que torna difícil as ações de controle, diferentes espécies de *Leishmania* atuam como agentes etiológicos da doença. Nas Américas, a LV é causada apenas pela *L. chagasi*, enquanto que a LTA têm como agentes etiológicos mais frequentes a *L. braziliensis* e a *L. amazonensis* (GONTIJO e DE CARVALHO, 2003).

Os antimoniais pentavalentes como o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime) e o estibogluconato de sódio (Pentostan) são os medicamentos de primeira escolha para o tratamento as leishmanioses (TORRES-SANTOS *et al.*, 1999; TAKAHASHI *et al.*, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

O antimoniato de metilglucamina é especialmente eficaz no tratamento de leishmaniose cutânea, cutâneo-mucosa e visceral. O medicamento provoca regressão rápida das manifestações clínicas e hematológicas da doença. Devido às baixas dosagens e tratamentos descontínuos, começaram a ocorrer falhas na terapia e consequente aumento de parasitos resistentes (RATH *et al.*, 2003). O principal esquema de tratamento recomendado consiste na administração intramuscular ou endovenosa de 15 a 20mg de SbV/kg/diariamente, durante 20 a 30 dias, obtendo-se um percentual de cura de 60% a 90% (LIMA *et al.*, 2007). Uma vez que o antimoniato de metilglucamina é rapidamente absorvido e, praticamente, 90% do antimônio são excretados pelos rins nas primeiras 48 horas, faz-se necessária a administração de doses elevadas do fármaco, em regime contínuo, para garantir uma concentração adequada de antimônio nos tecidos e, assim, obter a eficácia do tratamento. Efeitos colaterais como nefrites, distúrbios gastrintestinais, cardiovasculares e respiratórios têm

sido observados com frequência em pacientes tratados com esses medicamentos (RATH *et al.*, 2008).

Alternativamente, o antifúngico Anfotericina B, e a diamina aromática (Pentamidina) são utilizados clinicamente no tratamento das formas cutâneo-mucosas graves ou em situações onde a LTA não responde ao tratamento com antimonialis (DEDET e PRATLONG, 2003). Embora esses fármacos sejam bastante eficientes no tratamento das leishmanioses, seus elevados efeitos colaterais limitam sua utilização (RATH *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2007).

Recentemente, outros fármacos foram adicionados ao arsenal quimioterápico para tratamento da leishmaniose. Entre eles, pode-se citar os derivados alquil-lisofosfolipídicos, como o miltefosina (hexadecilfosfocolina), edelfosina (ET-OCH) e ilmofofosina (BM 14440), medicamentos desenvolvidos para o tratamento de câncer e também o antibiotótico paramomicina (LIMA *et al.*, 2007). Estudos de fase 2 e 3 contra leishmaniose visceral na Índia demonstraram que a taxa de cura foi de 97% em pacientes com administração oral de 2,5 mg/kg/dia de miltefosina por 4 semanas (SUNDAR *et al.*, 1998; 2002). Soto e colaboradores (2004), realizando estudos em pacientes com leishmaniose cutânea na Colômbia e na Guatemala tratados com miltefosina (2,5mg/kg/dia via oral, por 28 dias), observaram taxas de cura de 91% na Colômbia e 53% na Guatemala.

## **2.2 Tripanotiona redutase**

Diferentes estudos de moléculas promissoras para o tratamento das leishmanioses têm demonstrado a atividade inibitória destes compostos em diferentes enzimas e vias metabólicas essenciais à sobrevivência dos parasitos (CHEN *et*

*al.*, 2001; ROSSI-BERGMANN *et al.*, 2004; SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004; TORRES-SANTOS *et al.*, 2009).

Os principais fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses (Glucantime e Pentostan) atuam ligando-se e inibindo diferentes proteínas do parasito, particularmente enzimas envolvidas na glicólise e oxidação de ácidos graxos, responsáveis pela manutenção dos níveis de ATP essenciais à sobrevivência dos parasitos (MISHRA *et al.*, 2009).

Células vivas dispõem de duas classes de moléculas de baixa massa molecular com um amplo espectro de funções biológicas, as poliaminas e os compostos contendo grupamento tiol. Entre outras, as poliaminas estão envolvidas na síntese de proteínas, crescimento celular e desenvolvimento; o peptídeo glutatona (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinilglicina) está envolvido na manutenção do balanço redox e na regulação de diversos aspectos do metabolismo (BOND *et al.*, 1999). A forma tiol da glutatona, GSH, funciona como um agente protetor, mantendo um ambiente redutor no interior da célula. Quando oxidada à glutatona dissulfeto, a reação libera radicais livres e agentes oxidantes. A enzima glutatona redutase (GR) garante que os altos níveis de tiol sejam preservados, catalisando a redução da forma dissulfeto (KARPLUS e SCHUZ, 1989).

Tripanosomatídeos utilizam substitutos de poliamina-glutatona para funcionar em papéis similares de proteção e regulação (FAIRLAMB e CERAMI, 1992). Foram identificadas três moléculas capazes de substituir funcionalmente a glutatona: tripanotona, glutatonaileespermidina e homotripanotona, sendo que a tripanotona é a que mais se assemelha à glutatona, sugerindo uma função biológica similar à de GSH na remoção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio formadas pelos processos metabólicos ou quando os

parasitos estão sujeitos a estresse oxidativo proveniente da resposta imune do hospedeiro. Os substitutos podem ainda regular níveis de poliamina e influenciar o crescimento e o desenvolvimento celular. Apesar de não possuírem a GR, tripanosomatídeos contêm baixos níveis de glutatona. A enzima tripanotiona redutase é responsável pela conversão da tripanotiona dissulfeto em dois isômeros de tiol-dihidrotripanotiona, que pode reduzir GSSG a GSH pela troca tiol-dissulfeto (FAIRLAMB e CERAMI, 1992).

A GR humana e TR são ambas oxiredutases dissulfeto contendo flavina, NADPH-dependentes. Elas funcionam como homodímeros da massa molecular, sendo a massada da subunidade de 52-54 kDa, e compartilham cerca de 30% da sequência. Seus resíduos chave envolvendo a catálise são conservados, mas observou-se que cada enzima é específica de seu organismo, apesar das similaridades mecánísticas e estruturais, tornado a TR um alvo terapêutico de grande importância (FAIRLAMB e CERAMI, 1992).

A tripanotiona sintetase (TS) e a tripanotiona redutase (TR) são enzimas alvo dos compostos antimoniais. A TS sintetiza um conjugado de glutatona-espermidina chamado tripanotiona (N1-N8-bis(glutathionil) espermidina) e TR mantém essa molécula reduzida. O sistema tripanotiona/TR substitui muitas das funções antioxidantes e metabólicas dos sistemas glutatona/glutathionil redutase (GR) e tireodoxina/ tireodoxina redutase presentes em outros organismos, por essa razão, são necessários à sobrevivência do protozoário (BAIOCCO *et al.*, 2009). Cunningham e Fairlamb (1995) demonstraram que os antimoniais pentavalentes inibem a TR e que sua redução pelo NADPH é essencial para a inibição *in vivo*. Os antimoniais interferem no metabolismo induzindo efluxo rápido de

tripanotiona e glutationa intracelulares e inibindo a TR em células intactas. Apesar dessas descobertas, as bases moleculares da interação do antimonial com a TR e sua inibição ainda são desconhecidas (RATH *et al.*, 2003; BAIOTTO *et al.*, 2009).

Além de exercer uma função fundamental para o parasito, outra característica que faz com que a TR seja um alvo interessante para o desenvolvimento racional de fármacos antiparasitários é a sua significativa diferença estrutural em relação à glutationa redutase (GR), enzima com função correspondente em mamíferos. As principais diferenças entre a TR e a GR estão relacionadas ao tamanho, carga e distribuição dos bolsões hidrofílicos/hidrofóbicos. Estas diferenças fazem com que o sítio ativo da TR, em comparação com o da GR, seja capaz de acomodar facilmente substratos apresentando grupos mais volumosos (GIRAULT *et al.*, 2001). Além disso, a TR apresenta resíduos carregados negativamente e regiões hidrofóbicas em seu sítio ativo que são capazes de interagir, *via* interações eletrostáticas e de van der Waals, respectivamente, com seu substrato. Ao contrário, a GR apresenta resíduos de arginina, carregados positivamente, que interagem por ligação eletrostática com seu substrato (BOND *et al.*, 1999) (Figura 3).

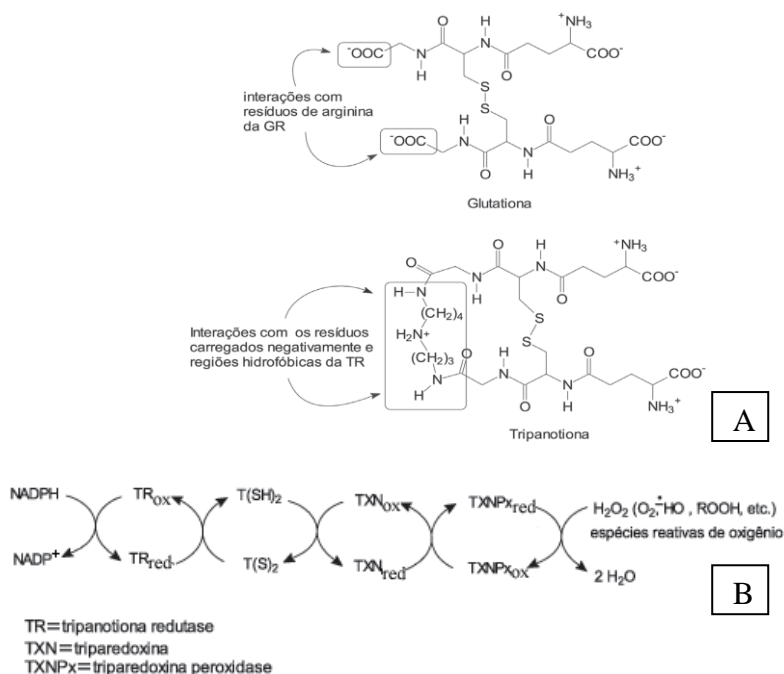


Figura 3: Estrutura e função enzimática da tripanotona redutase. A) Comparação entre as estruturas da glutationa e tripanotona, substratos da GR e TR, respectivamente; B) Cascata de eventos dependentes da TR responsáveis pela neutralização das espécies reativas de oxigênio Fonte: OLIVEIRA *et al.*, 2008.

## 2.3 Chalconas

As chalconas, ou 1,3 diaryl-2-propen-1-onas (Figura 4), são compostos precursores da via de biossíntese de flavonóides, sendo encontrados na natureza, em plantas rasteiras ou arbóreas, em diferentes órgãos vegetais, sobretudo nas flores. Esses



compostos apresentam coloração amarela que passa a vermelha em meio alcalino (ÁVILA, 2008).

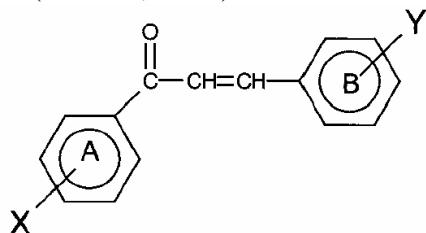


Figura 4: Estrutura básica de chalconas contendo substituintes (AX e BY). Fonte: Lunardi *et al.* (2003).

Quimicamente são definidas como cetonas aromáticas  $\alpha,\beta$ -insaturadas, constituídas por dois anéis benzênicos conectados por uma ponte de 3 carbonos, tendo conjugados um grupamento carbonílico e uma porção olefínica (CESARIN, FERREIRA e BRAZ, 2001). Constituem uma das maiores classes de produtos naturais, com ampla distribuição em plantas têm sido motivo de grande interesse por suas funções farmacológicas (NOWAKOWSKA, 2007). Plantas que naturalmente contêm chalconas, tais como das famílias Fabaceae (*Glycyrrhiza*), Piperaceae (*Piper*) e Ruscaceae (*Ruscus*) têm sido largamente utilizadas pela medicina popular na Ásia, África e América do Sul (NI, MENG e SIKORSKI, 2004).

As chalconas naturais e seus derivados sintéticos são amplamente descritos por apresentarem propriedades antioxidante, antitumoral, antiinflamatória, bactericida, antimalárica, antifúngica, antiviral e leishmanicida (NOWAKOWSKA, 2007; NI, MENG e SIKORSKI, 2004).

A licochalcona A, uma chalcona oxigenada isolada das raízes de uma planta chinesa (*Glycyrrhiza*), inibiu o crescimento

de amastigotas intracelulares e promastigotas de *L. major* e *L. donovani* (CHEN *et al.*, 1993). Da mesma forma, Torres-Santos *et al.* (1999) demonstraram significativa atividade *in vitro* da chalcona 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (DMC) contra promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Boeck *et al.* (2006) demonstraram que análogos da 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (DMC), contendo grupamentos nitro, flúor ou bromo na posição *para* do anel A, apresentaram atividade leishmanicida seletiva aumentada contra os parasitos, quando comparados com DMC. Zhai *et al.* (1995), estudando a atividade leishmanicida da licochalcona A, observaram que este composto é capaz de alterar a estrutura das mitocôndrias do parasito, inibindo seu funcionamento. Este mesmo grupo em 1999 mostrou que chalconas sintéticas derivadas da licochalcona A são capazes de alterar as funções mitocondriais, modificando não só sua estrutura, como a atividade das desidrogenases mitocondriais (ZHAI *et al.*, 1999).

Um estudo de Chen e colaboradores (2001), utilizando células permeabilizadas de *L. major* e *L. donovani*, e as enzimas fumarato redutase e succinato desidrogenase isoladas das mitocôndrias do parasito, mostrou que a licochalcona A tem a capacidade de inibir a atividade das mesmas, de forma concentração e tempo dependente, sendo que a fumarato redutase ( $CI_{50} = 1.2 \mu M$ ) é mais sensível que a licochalcona A que a succinato desidrogenase ( $CI_{50} = 19 \mu M$ ). Essas enzimas são de grande importância para o ciclo do ácido cítrico, estando presentes na mitocôndria, possível alvo da atividade leishmanicida das chalconas.

Lunardi *et al.* (2003) testaram a atividade leishmanicida de análogos de chalconas contendo grupamentos cloro ou bromo. Estes compostos apresentaram inibição concentração

dependente do crescimento de promastigotas de *L. braziliensis*. Os resultados deste trabalho juntamente com os de Boeck *et al.* (2006) demonstram que a presença de substituintes nos anéis aromáticos das chalconas são críticos para sua atividade leishmanicida.

Estudando a atividade de chalconas substituídas derivadas da 4-metoxichalcona e da sulfonamida 4-metoxichalcona, Andrighetti-Fröhner *et al.* (2009) observaram que a maioria dos derivados da sulfonamida 4-metoxichalcona mostraram-se mais potencialmente ativos que os derivados da 4-metoxichalcona. Esses compostos apresentaram valores de IC<sub>50</sub> contra promastigotas de *L. braziliensis* e *L. chagasi*, intermediários entre a anfotericina e a pentamidina, fármacos usualmente utilizados no tratamento da leishmaniose.

Estudos da relação estrutura-atividade de chalconas têm permitido deduzir que a adição de substituintes é uma importante estratégia para reduzir a toxicidade e aumentar o potencial leishmanicida (KO *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2003; GUTTERIDGE *et al.*, 2007).

Considerando os promissores resultados descritos na literatura, a factibilidade de síntese em escala de chalconas contendo substituintes diversos, a avaliação da atividade leishmanicida deste grupo de moléculas na busca de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses é relevante.

### **3. Objetivos**

#### **3.1.1 Objetivo geral**

Avaliar o potencial leishmanicida *in vitro* de chalconas substituídas e padronizar a expressão e purificação da enzima tripanotona redutase de *L. braziliensis*.

#### **3.1.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a atividade leishmanicida de chalconas substituídas contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e *L. chagasi*;
- Padronizar a amastigogênese *in vitro* de *L. chagasi*;
- Avaliar a citotoxicidade de chalconas substituídas frente a células de linhagem J774.A1 e macrófagos murinos;
- Avaliar o potencial de compostos ativos como indutores de NO em macrófagos murinos;
- Clonar, expressar e testar a viabilidade da enzima tripanotona redutase (TR) de *L. braziliensis*;
- Avaliar o efeito inibitório sobre a LbTR de *Leishmania braziliensis* de chalconas ativas.

## 4 Metodologia

### 4.1 Chalconas

As chalconas utilizadas neste trabalho foram disponibilizadas pelo laboratório de Estrutura e Análise, coordenado pelo professor Dr. Ricardo José Nunes do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Em um balão de reação de 100 ml e 1 boca, colocou-se a acetofenona (2 mmol), o aldeído (2 mmol) e metanol (15 ml). Dissolveram-se os reagentes sob agitação magnética e em seguida, adicionou-se lentamente KOH 50% v/v (60 gotas). Deixou-se a reação sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por 24 horas. Após este período, adicionou-se água destilada à reação, o que, na maioria das vezes, provocou a precipitação dos compostos, e acidificou-se a mesma com ácido clorídrico 10%, para neutralização do meio. Nos casos em que não houve precipitação, levou-se a solução ao freezer por um tempo, para forçar a precipitação em temperatura reduzida. Filtrou-se em funil de Büchner, verificou-se a pureza por cromatografia em camada delgada (CCD) e, quando necessário, as chalconas foram recristalizadas em diclorometano e precipitadas em hexano. Todas as chalconas obtidas foram completamente caracterizadas por ponto de fusão, infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . As estruturas inéditas foram confirmadas por análise elementar (CHN).

As estruturas básicas das chalconas das séries D, J e M foram sintetizadas, caracterizadas e purificadas pela doutora Louise Domeneghini Chiaradia e estão apresentadas na figura 5.

As estruturas moleculares dos compostos se encontram no Apêndice A.

As chalconas foram solubilizadas em DMSO puro (Merck), na concentração de 50mM e mantidas a -20° C até o uso.

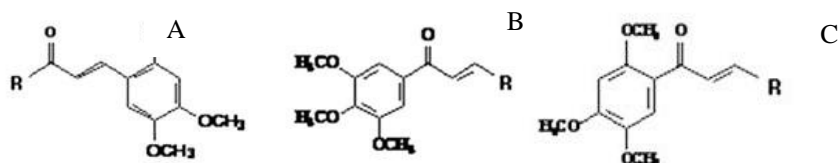


Figura 5: Estrutura básica das chalconas das séries D, M e J. A) chalcona da série D, onde R representa o radical variável da série; B) chalcona da série M onde R representa o radical variável da série; C) chalcona da série J, onde R representa o radical variável da série.

## 4.2 Parasitos

Promastigotas de *L. braziliensis* (cepa MHOM/BR/96/LSC96-H3) (GRISARD *et al.*, 1999) e de *L. chagasi* isolada de cão (MHOM/BR/2008/LSC-D2), foram obtidas do criobanco do Laboratório de Protozoologia cultivadas a 26°C em meio Schneider pH 7,2, suplementado com 5% de SBF e 2% de urina humana e 100 U de penicilina G e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma).

Com a finalidade de assegurar a infectividade das cepas, 10<sup>6</sup> promastigotas foram inoculados no coxim plantar de hamsters (*Mesocricetus auratus*) e, após um período de cerca de 45 dias, os animais foram anestesiados com quetamina e submetidos à biópsia aspirativa para isolamento dos parasitos.

Os parasitos foram cultivados em garrafas de cultura contendo meio Schneider, acrescido de 5% de SBF e 2% de urina, a 26°C, sob agitação branda. As amostras foram identificadas especificamente através de PCR-RFLP (VOLPINI *et al.*, 2004).

### **4.3 Bioensaios**

#### **4.3.1 Avaliação da atividade de chalconas contra formas promastigotas de *Leishmania***

As 71 chalconas foram triadas contra formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*, utilizando-se 180 µL de uma suspensão de parasitos a uma concentração de  $5 \times 10^6$  parasitos/mL e 20µL dos compostos em duas concentrações (500 e 50µM), incubando por 48h a 27°C, e realizando uma avaliação qualitativa em microscópio invertido.

Os compostos que mostraram completa inibição do crescimento parasitário nas duas concentrações testadas foram ensaiados contra formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. chagasi* para determinação da concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>). Para tanto, 180µL de uma suspensão de parasitos a  $5 \times 10^6$  parasitos/mL de meio Schneider suplementado com 5% SBF e 2% de urina foram incubados por 48h, a 26°C com 20 µL das chalconas em concentrações decrescentes de razão cinco, a partir de 50µM. Após o período de incubação, foram adicionados 50µL de uma solução de MTT a 2 mg/mL e incubado por 4h, sob abrigo da luz, a 26°C. As placas foram centrifugadas a 475xg, por 7min, o meio aspirado e adicionado 100µL de DMSO, incubando-se as placas por 30 min a 27° C e agitando-as manualmente para solubilização dos cristais de formazan. A leitura foi realizada em leitor de microplacas

Tecan, na absorvância de 540nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos duas vezes para avaliar a reprodutibilidade dos resultados e a manutenção da atividade dos compostos em solução. As análises estatísticas foram realizadas no programa Instat 3, através de ANOVA e regressão linear.

#### **4.3.2 Determinação da citotoxicidade pela técnica colorimétrica do MTT**

A atividade mitocondrial foi avaliada através da técnica do MTT, conforme descrito por Loosdrecht *et al.* (1991) e modificada por Sieuwerts *et al.* (1995).

Para a avaliação da citotoxicidade das chalconas, células J774.A1 foram cultivadas em garrafas de cultura de 25cm<sup>2</sup> contendo 5mL de meio DMEM, suplementado com 10% de SBF, mantidas em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e repicadas semanalmente. Após a remoção do meio de cultura, as monocamadas celulares foram removidas da garrafa com o auxílio de espátula estéril TPP® e transferidas para tubo falcon de 15mL na presença de DMEM acrescido de 10% SBF. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão do corante azul de tripan 0,02% e a concentração foi ajustada para 2x10<sup>5</sup> células/mL. Duzentos microlitros da suspensão celular foram distribuídos em placas de 96 orifícios TPP® e incubados a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 12 horas. A seguir, as células foram lavadas com PBS 1X estéril, pH 7,2, e adicionado 180µL de meio DMEM 10% SBF e 20µl das chalconas em concentrações decrescentes de razão cinco a partir de 500µM, e as células mantidas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. Como controle, as monocamadas foram incubadas na presença de 1% de DMSO, 1µM de Anfotericina B e em meio de cultura. Após a incubação, foram



adicionados 50µL de uma solução de MTT a 2 mg/mL e a placa novamente incubada a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 4 horas, ao abrigo da luz. A seguir, o meio foi aspirado e adicionado 100 µL de DMSO, incubando-se as placas por 30 min a 27° C e agitando-as manualmente para solubilização dos cristais de formazan. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (Tecan) a 540nm. Os resultados foram expressos em CC<sub>50</sub>. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos 3 vezes, com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade dos resultados. A análise estatística foi realizada no Programa Instat 3, através de ANOVA e regressão linear.

#### **4.3.3 Padronização da amastigogênese de *Leishmania chagasi***

A padronização da amastigogênese de *L. chagasi* foi baseada nos trabalhos de Balanco *et al.* (1998), Teixeira *et al.* (2002) e Gaspar-Silva (2008).

A partir de uma cultura estabelecida de promastigotas de *L. chagasi*, 5x10<sup>6</sup> parasitos/mL foram inoculados em 5mL meio Schneider pH 7.2, suplementado com 5% de SBF e 2% de urina, em frasco de cultura de 25cm<sup>2</sup> sem aeração, a 27° C, até atingirem a fase exponencial tardia, com 11x10<sup>7</sup> parasitos/mL, cerca de 3 dias após o inóculo.

Cinquenta, oitenta e cem milhões de parasitos por mililitro de cultura foram inoculados em meio Schneider, 20% SBF e 2% urina, em pH variando meio ponto de 5.0 a 7.0, e incubados em garrafas de cultivo de 25cm<sup>2</sup> sem aeração, a 34°C e 37°C, por 24h a 72h.

A diferenciação e viabilidade dos parasitos foram acompanhadas diariamente através de avaliação em microscópio

invertido, pela exclusão do corante vital azul de tripan 0.2% e pela coloração pelo Giemsa.

#### **4.3.4 Avaliação da atividade das chalconas contra formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e *L. chagasi***

Para a avaliação da atividade antiparasitária contra amastigotas intracelulares, células J774.A1 foram incubadas na presença de amastigotas de *Leishmania*, na proporção de 10 parasitos por célula, em meio DMEM 10% SBF a 34°C, sob agitação, por 24h, conforme descrito por Gaspar-Silva (2008).

Duzentos microlitros da suspensão celular ( $2 \times 10^5$  células/mL) foram distribuídos em placas de 96 orifícios TPP®, e mantidos a 34°C, 5% CO<sub>2</sub>, por 12h. A seguir, as células foram lavadas e foram adicionados 180µL de meio DMEM 10% SBF e 20µl dos chalconas em concentrações decrescentes (10, 5, 2,5, 1 e 0.5µM), e a placa mantida a 34°C ou 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, por 48h. Foram avaliadas somente as chalconas cujo índice de seletividade (CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>) foi maior que 20. Como controle, as monocamadas foram incubadas na presença de 1% de DMSO e 0,1µg/mL de Anfotericina B e em meio de cultura. A seguir, o meio foi removido através de aspiração a vácuo, a placa foi seca, fixada com metanol e corada pelo Giemsa. A avaliação foi feita em microscópio invertido, através da avaliação da infecção de 500 células de cada orifício. O percentual de inibição foi calculado conforme descrito por Guru *et al.* (1989) e modificado por Lakshimi *et al.* (2007), utilizando a seguinte fórmula:  $PI = 100 - (T/C.100)$ , onde T é a média de três repetições, da soma dos amastigotas intracelulares encontrados nas células no tratado; C é a média de três repetições da soma dos amastigotas intracelulares encontrados nas células no controle de DMSO

1%. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos 3 vezes com o objetivo de avaliar a manutenção da atividade dos compostos e a reprodutibilidade dos resultados.

#### **4.3.5 Avaliação da citotoxicidade e atividade contra formas amastigotas de *L. braziliensis* e *L. chagasi* em macrófagos murinos**

Células obtidas da medula óssea de camundongos Balb/C foram cultivadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 7 dias em placas de 6 orifícios na presença de meio DMEM acrescido de 10% SBF e 30% v/v do sobrenadante de cultura celular da linhagem L929 (fator de diferenciação de macrófagos). Após a diferenciação, as células foram lavadas em PBS, tripsinizadas, testadas quanto a sua viabilidade pelo teste de exclusão do corante vital azul de tripan 0.02% e distribuídas em placas de 96 orifícios (20000 células/poço), e cultivadas por 12h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Para os ensaios de atividade leishmanicida, as monocamadas foram infectadas com formas amastigotas axênicas de *L. braziliensis* ou *L. chagasi*, na razão de 5 parasitos/célula, e incubados a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 12h. A seguir, as monocamadas infectadas foram lavadas com PBS 1X estéril, pH7.2, e foram adicionados concentrações decrescentes dos compostos (10, 5, 2.5, 1 e 0.5µM) e as culturas mantidas por 48h a 34°C (Lb) ou 37°C (Lc), 5% CO<sub>2</sub>, em incubadora umidificada. Após a incubação, o meio foi retirado, as monocamadas lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas pelo Giemsa. A avaliação da atividade e a análise estatística foram realizadas da mesma forma que para células J774.A1 infectadas.

Para determinação da citotoxicidade, as monocamadas de macrófagos não infectadas foram incubadas com as chalconas e com 1% de DMSO e 1µM de Anfotericina B, nas

condições já discutidas no item 4.3.2. Após a incubação, a citotoxicidade foi avaliada pelo método do MTT, conforme discutido no item 4.3.2. Os resultados foram expressos em CC<sub>50</sub>. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos 3 vezes com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade dos resultados. A análise estatística foi realizada no programa Instat 3, através de testes de ANOVA e regressão linear.

#### **4.3.6 Avaliação da produção de NO em macrófagos expostos as chalconas**

Para avaliação da indução de óxido nítrico foi realizada a determinação de nitrito no sobrenadante dos experimentos de citotoxicidade e de avaliação de atividade contra formas amastigotas em macrófagos murinos. Para tanto, 100µL do sobrenadante de macrófagos tratados com as chalconas ou estimulados com 10µg de LPS (lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, Sigma-Aldrich, Saint Louis) (controle positivo) foram misturados com igual volume do reagente de Griess (Sufanilamida, 1%; diidrocloreto de naftiletilenodiamina, 1% e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5%) à temperatura ambiente por 10min. A absorbância foi monitorada espectrofotometricamente a 540 nm.

### **4.4 Clonagem da Tripanotiona Redutase de *Leishmania braziliensis***

#### **4.4.1 Extração do DNA de *L. braziliensis***

Aproximadamente 20mL da cultura na fase exponencial do crescimento foram centrifugadas a 1.500xg, por 10min a 4°C e lavados duas vezes em PBS pH 7,2, e o sedimento celular foi suspenso em 500µL de tampão de lise (Tris-HCl 10mM pH 7,6; MgCl<sub>2</sub> 5mM; NaCl 10mM; SDS 0,5%), acrescido de

100µg/mL de proteinase K (Sigma) e incubado a 56°C por 2h. O DNA foi extraído pelo método fenol-clorofórmio (SAMBROOK E RUSSEL, 2001). Após precipitação com isopropanol 100%, o DNA foi lavado duas vezes em etanol 70%, suspenso em 100µL de água ultrapura e tratado com RNase. A concentração e pureza de DNA foi determinada em espectrofotômetro (BioPhotometer – Eppendorf, Germany), 260/280 nm.

O DNA extraído das culturas de *Leishmania braziliensis* H3, juntamente com controles de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, foram submetido a PCR, utilizando os iniciadores 150 (5'-GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA-3') e 152 (5'-(C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT (A/T)TTACACCAACCCC-3'), dirigidos para a região constante do minicírculo de k-DNA de *Leishmania* sp., gerando um produto de 120pb (VOLPINI *et al.*, 2004). Os produtos foram precipitados com isopropanol (100%), lavados com etanol 70% e suspensos em água ultrapura. Vinte microlitros do produto da amplificação de DNA de cada amostra foi incubado com 2U das enzimas de restrição *Ava*I e *Hae*III em tampão apropriado a 37°C/4h e a seguir 10µL do DNA digerido foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e corado pelo brometo de etídeo.

#### **4.4.2 Amplificação do gene de tripanotona redutase (TR) de *L. braziliensis***

A metodologia de amplificação, clonagem e expressão da TR de *L. braziliensis* foi realizada conforme descrito por Castro-Pinto *et al.*, (2008) para clonagem da TR de *L. amazonensis*.

Os iniciadores LB-TR1 (5'-CATATGATGCCCCGCGGTACGACCTTG-3'), contendo sítio de restrição para a enzima *Bam*HI e LB-TR2 (5' –

GGATCCGCCTGTCATCCTCGCCGCTGCC – 3') contendo sítios de restrição para as enzimas *Nde*I, desenhados a partir das sequências do gene de TR de *L. braziliensis* disponíveis no GeneBank (números de acesso: AM494942.1, XM\_001561799.1) utilizando o programa DNASTar, foram utilizados para amplificação do gene da TR de *L. braziliensis*. A amplificação do DNA foi realizada em tampão Tris HCl pH 8,8 contendo 3.5mM de MgCl<sub>2</sub> e 75mM de KCl, utilizando-se 0.2mM de dNTP, 1μM dos iniciadores iniciadores LB-TR1 e LB-TR2, 1.25 unidades de Taq DNA polimerase, além de 4.5μL de H<sub>2</sub>O DEPC e 100ng de DNA por reação. Após uma desnaturação inicial a 94°C (4 min), as amostras foram submetidas a 30 ciclos de desnaturação (94°C/30s), ligação dos iniciadores (64°C/30s) e extensão (72°C/2 min), e um ciclo de extensão final de 5min. Três microlitros do produto de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM, pH 8), para verificação do produto da amplificação, e o gel foi corado pelo brometo de etídeo, sendo visualizado em transiluminador MacroVue UV 20<sup>®</sup> (Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco) e os resultados digitalizados.

#### **4.4.3 Purificação e clonagem do gene da TR**

O volume total do produto amplificado (40μL) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e, após coloração pelo brometo de etídeo, a banda única de 1553pb gerada pela amplificação foi excisada e o fragmento de DNA purificado utilizando-se o sistema GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire). A purificação da banda foi comprovada por eletroforese em gel de agarose 1%.

A clonagem objetivando o aumento do número de cópias do fragmento de DNA foi realizada incubando o vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega, Madison) (Figura X) com o fragmento purificado, na presença da enzima T4 ligase, em tampão apropriado, a 16°C, por 12h. O produto da reação, após ser precipitado com isopropanol 100% e lavado com etanol 70%, foi ressuspenso em água ultrapura. Bactérias competentes da linhagem DH5α (*Escherichia coli*) foram transformadas por eletroporação (1.5mV, por 2ms) e os clones recombinantes selecionados com base na seleção de cor azul/branco das colônias crescidas em meio LB Agar suplementado com ampicilina (100µg/mL), X-gal (20µg/mL) e IPTG (40µg/mL). A presença dos insertos e o tamanho dos mesmos foi comprovada através da PCR diretamente de colônias, utilizando-se os iniciadores pGEM-F (5'-CGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATA-3') e EXCEL-R (5'-GTTGTAAACGACGGCCAGTGAAT-3'), seguido de eletroforese em gel de agarose 1% e coloração pelo brometo de etídeo. Os resultados foram visualizados em transiluminador MacroVue UV 20® (Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco) e digitalizados. Colônias contendo o inserto foram isoladas e crescidas sob agitação a 37°C em meio LB líquido e submetidas à extração do DNA plasmidial, para posterior sequenciamento do inserto.

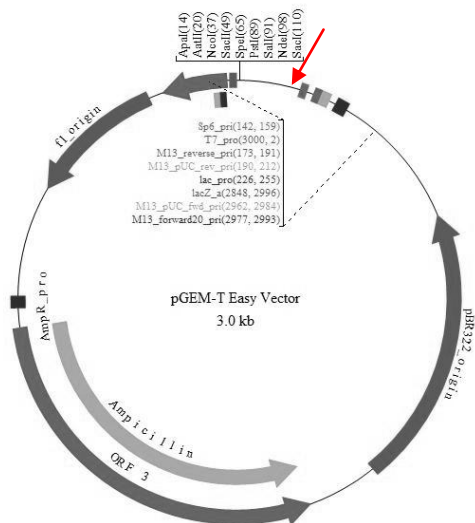


Figura 6: Mapa do plasmídio pGEM-T easy vector. A seta externa ao plasmídio indica o local de inserção do gene clonado, dividindo o gene da galactosidase, *ori* indica a origem da transcrição e a região Amp indica a região do gene de resistência à ampicilina. Fonte: [www.promega.com](http://www.promega.com)

#### 4.4.4 Sequenciamento do DNA

O sequenciamento dos clones selecionados foi realizado em equipamento *MegaBace 1000<sup>®</sup> DNA Analysis System* (GE/Amersham Biosciences, Buckinghamshire), com a colaboração da doutoranda Aline Daiane Schlindwein. A reação de sequenciamento foi preparada a partir do DNA plasmidial e o kit *DYEnamic<sup>®</sup> ET Dye Terminator* (GE/Amersham Biosciences, Buckinghamshire) conforme especificações do fabricante, utilizando-se os iniciadores LBTR1 e LBTR2 e os iniciadores do vetor (pGEM F e Excel R). A reação foi realizada



na presença de 5pmol dos iniciadores e aproximadamente 800ng do DNA plasmidial, nas seguintes condições térmicas: 95°C por 25s, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95°C/15s, ligação dos iniciadores a 55°C/30s e extensão a 60°C/80s. Os produtos marcados foram precipitados, utilizando-se isopropanol 70% e etanol absoluto, para remoção dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados. A seguir os produtos purificados foram eletroinjetados a 2KV por 100s e eletroeluídos por 150min a 7KV. Devido ao tamanho do fragmento foi realizada uma subclonagem utilizando-se a enzima *SalI*, sendo que o inserto resultante de aproximadamente 1100pb, foi sequenciado nas mesmas condições descritas anteriormente. As análises das sequências foram realizadas no Laboratório de Bioinformática da UFSC ([www.bioinformatica.ufsc.br](http://www.bioinformatica.ufsc.br)) utilizando-se o pacote *Phred/Phrap/Consed* sendo consideradas somente as sequências com qualidade Phred >20. A confirmação da identidade dos fragmentos foi realizada utilizando o programa BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) e as sequências obtidas foram alinhadas utilizando-se o programa *ClustalW*. A sequência de aminoácidos para as seis possíveis fases de leitura foi predita através do programa *Translate* do pacote Expasy ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) e analisada quanto à presença da cauda de poli-histidina e à existência de códons de parada. Outros programas do pacote Expasy, além do programa *BioEdit*®, foram utilizados para a análise da sequência aminoacídica predita.

#### **4.4.5 Expressão e purificação da tripanotiona redutase recombinante de *Leishmania braziliensis* (LbTR)**

Para a realização da subclonagem e expressão do gene *LbTR*, bactérias transformadas com o plasmídio pGEM-T Easy

clonado com o inserto ou com o vetor de expressão pET14b (figura 7) foram submetidas a extração do DNA plasmidial. Os plasmídios obtidos por esta reação foram digeridos a 37°C, por 3h, com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* (60U), em tampão apropriado, em volume final de 40µL, e submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Os fragmentos de DNA correspondentes ao plasmídio pET14b e ao gene da tripanotona redutase foram purificados com o sistema GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire). O inserto foi ligado ao vetor de expressão pET14b através da enzima T4 ligase, conforme descrito anteriormente e, após precipitado com isopropanol 70% e lavado com etanol 100%, o produto da reação foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* da linhagem BL21 (DE3), eletroporadas a 1.5mV, por 2ms. Os transformantes foram cultivados a 37° C por 18h em placas com meio sólido LB/amp para seleção dos clones positivos. As colônias positivas foram submetidas a PCR de colônia utilizando os iniciadores do inserto, LB-TR1 e LB-TR2, e o produto foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, corado pelo brometo de etídeo e visualizado em transiluminador MacroVue UV 20® (Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco) e os resultados digitalizados. Os clones positivos foram crescidos a 37°C em volume de 10mL em meio líquido sob agitação, por 12h. Tubos de cultura contendo de 10mL de meio LB líquido foram inoculados com 1mL da cultura, e crescidos a 37°C sob agitação até atingirem densidade óptica de 0.6, sendo então acrescidos 1mM de IPTG por tubo. Foram testadas diferentes condições de expressão, modificando-se o tempo e a temperatura de incubação (15° C, 27° C e 37° C, por 3h, 6h ou 12h).

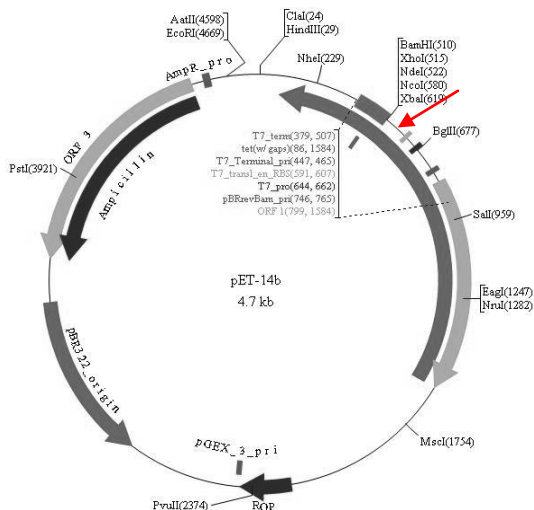


Figura 7: Mapa do plasmídio pET14b vector. A seta externa ao plasmídio indica o local de inserção do gene clonado, dividindo o gene da galactosidase, *ori* indica a origem da transcrição e a região Amp indica a região do gene de resistência à ampicilina. Fonte: [www.promega.com](http://www.promega.com)

As células foram centrifugadas a 3000xg por 10min a 4°C, e o sedimento foi suspenso em 200μL de tampão de lise gelado (Tris–Cl 50mM pH 7.5/KCl 100mM/EDTA 5mM) e rompidas mecanicamente com 12 ciclos de 30s de sonicação em potência 12. O lisado foi centrifugado a 12000xg por 15min a 4°C. As frações solúvel e insolúvel de cada condição de crescimento, bem como o controle não induzido, foram submetidos a eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, a 100V, e o gel foi corado com Comassie Blue 250. A confirmação da banda foi realizada por Western Blot usando anticorpo monoclonal anti-cauda de histidina.

A melhor condição de expressão na fração solúvel foi repetida em volume de 100mL e a proteína foi purificada em resina Ni-NTA agarose (Qiagen). Após equilibrada com tampão de imidazol ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  500mM,  $\text{NaCl}$  300mM, imidazol 25mM, pH8), a coluna foi carregada com a fração solúvel do sonificado, e mantida por 1h a 4°C, sob agitação. A coluna foi centrifugada a 700xg por 3min e líquido reservado em um microtubo novo para eletroforese. A resina foi lavada três vezes com 1mL de tampão de imidazol, e o líquido de cada lavagem reservado para eletroforese. A proteína foi eluída quatro vezes com 200  $\mu\text{L}$  de tampão de imidazol, sendo dialisada duas vezes por 12h contra tampão de Hepes (40mM)/EDTA (1mM) a 4° C. A concentração da *LbTR* recombinante foi determinada pelo método de Bradford (SAMBROOK E RUSSEL, 2001).

#### **4.4.6 Avaliação da atividade da *LbTR* e inibição da enzima por chalconas**

Para obtenção de um curva padrão, 100  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo *LbTR* em diluições sequenciais (1:10, 1:100 e 1:1000), 40mM de HEPES (pH 7,5), 1mM de EDTA, 0.15mM NADPH e 1 $\mu\text{M}$  de  $\text{T[S]}_2$  foram adicionados em cada orifício da placa de 96 poços Nunc®, conforme descrito por Hamilton *et al.* (2003). Como controles foram utilizados os inibidores clomipramina (6,5 $\mu\text{M}$ ) e ácido gálico (100 $\mu\text{M}$ ) e um controle sem a enzima. As soluções estoque do inibidor foram feitas usando misturas de co-solventes tampão e DMSO, para que a solução final dos experimentos não contenha mais que 1% (v/v) de DMSO. As soluções enzimáticas foram pré-incubadas com NADPH por 5 min a 27° C para facilitar o início da reação pela adição do substrato. Em seguida, foram adicionados 25 $\mu\text{M}$  de DTNB. A atividade enzimática foi avaliada pelo consumo de

NADPH, através de leitura da absorbância em espectrofotômetro a 410nm, no modo cinético, a cada 5min por 30min. Os resultados foram analisados por regressão não-linear da curva hiperbólica de gráfico de atividade contra concentração do substrato, usando a equação para inibição competitiva linear do programa GraFit 5 (Erithacus Soware Lbt).

Os experimentos com *LbTR* foram realizados de acordo com Cota *et al.* (2008), em placas de 96 poços usando tampão HEPES 40mM/ EDTA 1mM (pH 7.5), 0.15mM NADPH e 1μM de T[S]<sub>2</sub>. Cada poço do experimento recebeu 100μL de uma solução contendo 130ng da enzima, tripanotona (0.25nmol) e NADPH (50nmol). As chalconas, a uma concentração de 100 μM, foram adicionadas à mistura e incubadas a 30°C por 30min. Após este período, 25μM de DNTB (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), Ellman's reagent) foram adicionados. A atividade enzimática foi avaliada pelo consumo de NADPH, através de leitura da absorbância em espectrofotômetro a 410nm, no modo cinético, a cada 5min por 30min. Os resultados foram analisados por regressão não-linear da curva hiperbólica de gráfico de atividade contra concentração do substrato, usando a equação para inibição competitiva linear do programa GraFit 5 (Erithacus Soware Lbt). Equação de percentual de inibição =  $(1 - (\delta\text{Abs})_{\text{exp}}/(\delta\text{Abs})_{\text{contr}}) \times 100$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 BIOENSAIOS

#### 5.1.1 Avaliação da atividade leishmanicida de chalconas contra formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. chagasi* e citotoxicidade em células J774.A1

Das 71 chalconas triadas previamente contra formas promastigotas de *Leishmania*, 35 (D03, D04, D08, D09, D13, D14, M05, M06, M07, M08, M09, M10, M12, M15, M16, M17, M20, M26, M30, M32, M33, J06, J09, J12, J13, J14, J18A, J25, J29, J31, J33, J54, J55, J56, J69) mostraram 100% de inibição do crescimento parasitário nas concentrações padronizadas de 500 e 50 $\mu$ M. Os demais compostos não apresentaram atividade leishmanicida nas concentrações testadas. As  $CI_{50}$  dos compostos selecionados na triagem contra formas promastigotas de *L. braziliensis*, bem como sua  $CC_{50}$  para células da linhagem J774.A1 são apresentadas na Tabela 1.

Das 35 chalconas ativas, oito (22,8%) apresentaram índices de seletividade maior que 20 (D08, M10, M15, M17, M20, M30, M33, J09), e foram consideradas moléculas promissoras. Estas foram avaliadas quanto a sua  $CI_{50}$  para duas espécies de *Leishmania* e estes resultados comparados com a  $CC_{50}$ , e são apresentados na Tabela 2.

Dentro das repetições dos experimentos, observou-se uma baixa estabilidade dos compostos em solução, mesmo com armazenamento protegido da luz e à temperatura de -20°C. A repetição dos experimentos após 20 dias de estocagem dos compostos ao abrigo da luz, na temperatura de -20° C apresentou resultados bastante diferentes dos iniciais, com redução tanto da atividade antiparasitária, quanto da

citotoxicidade. Diante desta observação, os compostos não solubilizados passaram a ser armazenados em alíquotas e solubilizados somente na hora do uso.

Tabela 1: Valores médios de atividade leishmanicida (CI<sub>50</sub>) para promastigotas de *L. braziliensis* e citotoxicidade (CC<sub>50</sub>) para a linhagem celular J774.A1 de chalconas.

CHALC	<i>L. braziliensis</i> CI <sub>50</sub> (μM)	J774.A1 CC <sub>50</sub> (μM)	IS
ANF	1,31 (1,18 – 1,46)	~ 100	~ 76
D03	23,09 (19,07 – 27,96)	239,30 (231,21 – 247,66)	10,36
D04	24,39 (18,53 – 32,11)	209,31 (188,35 – 232,60)	8,62
D08	2,39 (2,05 - 2,80)	110,05 (69,21 - 174,99)	46,05
D09	26,17 (24,69 – 27,75)	199,30 (193,11 – 205,69)	4,56
D13	21,70 (18,05 – 21,10)	168,04 (152,11 – 185,64)	7,74
D14	25,36 (22,06 – 29,15)	202,72 (188,56 – 217,94)	7,99
M05	25,95 (21,52 - 31,3)	184,21 (166,04 - 204,38)	7,12
M06	17,94 (12,68 - 25,37)	164,85 (97,91 - 277,55)	9,19
M07	24,38 (17,72 - 33,54)	272,46 (255,65 - 290,37)	11,17
M08	16,6 (11,05 - 24,93)	30,26 (21,33 - 42,93)	1,82
M09	19,58 (16,63 - 23,06)	227,56 (218,4 - 237,11)	11,62
M10	28,03 (24,29 - 32,33)	652 (542,57 - 783,51)	23,26
M12	21,65 (17,81 - 26,32)	149,92 (125,15 - 174,03)	6,92
M15	1,13 (0,38 - 3,36)	373,03 (301,55 - 461,46)	330,12
M16	24,33 (23,45 - 25,24)	184,21 (166,04 - 204,38)	7,57
M17	2,23 (1,17 - 4,25)	100,59 (77,19 - 131,08)	45,11
M20	3,62 (2,09 - 6,26)	168,5 (149,55 - 189,85)	46,55
M26	30,38 (29,07 - 31,74)	191,05 (154,84 - 235,74)	6,29
M30	0,86 (0,45 - 1,63)	302,64 (268,99 - 340,51)	351,91
M32	14,05 (10,28 - 19,23)	134,1 (114,28 - 157,36)	9,54
M33	2,05 (1,33 - 3,15)	43,13 (18,8 - 98,94)	21,03
J06	29,82 (27,41 - 32,45)	190,61 (176 - 206,44)	6,39
J09	2,45 (0,94 - 6,37)	262,01 (206,00 - 333,26)	106,94
J12	34,82 (30,74 - 39,45)	208,24 (202,15 - 214,51)	5,98
J13	29,24 (25,36 - 33,71)	237,77 (213,1 - 265,29)	7,20
J14	33,02 (30,21 - 36,09)	138,15 (127,94 - 149,18)	4,18

<b>J18A</b>	14,10 (8,70 - 22,87)	17,83 (10,07 - 31,06)	1,26
<b>J25</b>	29,53 (26,76 - 32,58)	166,27 (133,55 - 207,02)	5,63
<b>J29</b>	31,98 (25,82 - 39,6)	188,41 (174,42 - 203,53)	5,89
<b>J31</b>	34,83 (31,02 - 39,12)	226,76 (204,86 - 251,05)	6,51
<b>J33</b>	28,32 (19,95 - 40,2)	27,26 (24,72 - 30,07)	0,96
<b>J54</b>	29,05 (26,76 - 31,54)	230,68 (196,99 - 270,14)	7,94
<b>J55</b>	30,47 (27,28 - 34,03)	248,06 (165,09 - 372,74)	8,14
<b>J56</b>	30,96 (27,54 - 34,8)	240,67 (232,71 - 248,89)	7,77
<b>J69</b>	32,54 (28,79 - 36,77)	312,92 (303,97 - 322,13)	9,61

Os resultados representam a média de três experimentos independentes, realizados em triplicata, com intervalo de confiança de 95%. O índice de seletividade (IS) refere-se à razão  $CC_{50}/CI_{50}$  para cada composto; ANF = Anfotericina B.



Tabela 2: Citotoxicidade frente à linhagem celular J774.A1 (CC<sub>50</sub>), atividade leishmanicida *in vitro* contra formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. chagasi* (CI<sub>50</sub>) e índice de seletividade (IS) de chalconas.

CHALC	CC <sub>50</sub> (μM)	CI <sub>50</sub> LB (μM)	IS	CI <sub>50</sub> LC (μM)	IS
<b>D08</b>	110,05 (69,21 - 174,99)	2,23 (1,92 - 2,58)	49,35	4,34 (3,96 - 4,75)	25,34
<b>M10</b>	652 (542,57 - 783,51)	23,59 (18,19 - 29,80)	27,64	25,6 (17,19 - 29,80)	25,46
<b>M15</b>	373,03 (301,55 - 461,46)	0,96 (0,52 - 1,77)	388,57	1,16 (0,69 - 1,94)	321,58
<b>M17</b>	100,59 (77,19 - 131,08)	2,7 (1,82 - 4,00)	37,25	2,04 (1,04 - 4,02)	49,30
<b>M20</b>	168,5 (149,55 - 189,85)	4,44 (3,15 - 6,25)	28,94	4,36 (3,47 - 5,49)	38,65
<b>M30</b>	302,64 (268,99 - 340,51)	1,33 (0,78 - 2,27)	227,55	1,53 (0,53 - 4,42)	197,80
<b>M33</b>	43,13 (18,8 - 98,94)	2,91 (2,00 - 4,23)	14,82	1,06 (0,43 - 2,59)	40,69
<b>J09</b>	262,01 (206,00 - 333,26)	2,58 (1,61 - 4,15)	101,55	3,73 (3,58 - 3,89)	70,24
<b>ANF</b>	29,69 (23,21 - 37,97)	1,67 (1,56 - 1,80)	17,78	1,21 (1,11 - 1,33)	24,74

Os resultados representam a média de três experimentos independentes, realizados em triplicata, com intervalo de confiança de 95%. O índice de seletividade (IS) refere-se à razão CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub> para cada composto; ANF = Anfotericina B.

### 5.1.2 Padronização da amastigogênese de *L. chagasi*

A obtenção das formas amastigotas axênicas de *Leishmania* sp. a partir de cultura de formas promastigotas em fase exponencial tardia já vem sendo realizada no laboratório de protozoologia para *L. amazensis* e *L. braziliensis*, conforme descrito por Gaspar-Silva (2008) em sua dissertação. A diferenciação de *L. chagasi* foi baseada nos protocolos já existentes para estas espécies, com algumas modificações.

A indução da diferenciação a partir de inóculos de  $50 \times 10^6$  parasitos/mL de cultura mostraram baixas taxas de diferenciação (abaixo de 50%), enquanto que aquelas provenientes de inóculos iniciais de  $100 \times 10^6$  parasitos/mL de cultura apresentaram alta mortalidade (80%) e baixa taxa de diferenciação em todos os pHs e temperaturas estudados. As melhores taxas de diferenciação e menores mortalidades ocorreram com as culturas estabelecidas a partir de um inóculo inicial de  $80 \times 10^6$  parasitos por mL.

As taxas de diferenciação das culturas em amastigotas axênicos a partir do inóculo inicial estabelecido apresentaram maiores taxas de diferenciação na temperatura de 37° C.

A diferenciação das culturas apresentou elevado rendimento após 48h de incubação a 37°C (50-90% amastigotas). A manutenção dessas culturas a 37°C por 72h ocasionou mortalidade elevada dos parasitos.

O número de parasitos, sua viabilidade pela exclusão do corante vital azul de tripan 0,2% e a taxa de diferenciação nos diferentes pHs analisados estão mostrados na tabela 3.

A condição de melhor diferenciação (90% amastigotas) ocorreu com inóculo de  $80 \times 10^6$  parasitos/mL em meio Schneider pH7.0, acrescido de 20% SBF e 2% urina, incubados

a 37° C por 48h, sendo esta condição utilizada nos experimentos de diferenciação.

Tabela 3: Número de parasitos, porcentagem de amastigotas e de parasitos viáveis após 48 horas de diferenciação a 37° C de promastigotas de fase exponencial tardia de *L. chagasi* em cinco condições de pH, a partir de um inóculo de  $80 \times 10^6$  parasitos/mL.

pH	Parasitos x $10^6$ /mL	% amastigotas	% parasitos viáveis
5.0	$112 \pm 6$	$38 \pm 3.2$	83
5.5	$107 \pm 4,8$	$35 \pm 4.5$	87
6.0	$121 \pm 8,2$	$55 \pm 3.0$	90
6.5	$118 \pm 5,1$	$77 \pm 4.9$	90
7.0	$122 \pm 4,6$	$93 \pm 2.4$	92

Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer, a viabilidade determinada pela coloração com azul de tripan e a porcentagem de amastigotas através da análise de 200 células em esfregaço corado pelo Giemsa. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

### 5.1.3 Avaliação da atividade leishmanicida de chalconas contra formas amastigotas de *L. braziliensis* e *L. chagasi* e citotoxicidade em células J774.A1 e macrófagos murinos derivados de medula óssea

A avaliação da atividade das chalconas contra amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e *L. chagasi* em células J774.A1 mostrou uma importante atividade dos compostos contra as formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* (tabela 4), ainda que quando avaliados contra amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e *L. chagasi*, a maioria dos compostos tenham mostrado atividade

significativamente menor (variando de 1.5 a 20 vezes) do que contra promastigotas da mesma espécie.

Dos compostos analisados, quatro apresentaram maiores índices de seletividade para as duas espécies. As chalconas M10 e M30 apresentaram os maiores índices de seletividades para ambas as espécies (CI<sub>50</sub> para *L. braziliensis* M10 = 0.13µM, SI = 2073 e M30 = 0.34µM, SI = 890; para *L. chagasi*, M10 = 8.71 µM, SI = 74.85 e M30 = 1.33 µM, SI = 227). Outros dois compostos (M15 e J09) apresentaram elevados índices de seletividade para ambas as espécies.

Os quatro compostos mais ativos foram avaliados também em macrófagos murinos derivados de medula óssea. A avaliação das quatro chalconas mais ativas contra macrófagos infectados com amastigotas de *L. braziliensis* e *L. chagasi* demonstrou a maior atividade da chalcona M30 (CI<sub>50</sub> = 2,22 e 2,4 µM para *L. braziliensis* e *L. chagasi*, respectivamente), que apresentou redução da infecção mesmo nas menores concentrações para as duas espécies estudadas, conforme figura 6. Os resultados são mostrados nas figura 8, 9 e 10.

Nenhuma das chalconas analisadas induziu a produção de óxido nítrico pelos macrófagos infectados ou não com amastigotas de *Leishmania* sp., o que demonstra que a atividade desses compostos independe da ativação da via metabólico do nitrato pelo macrófago para inibir a proliferação dos parasitos.

Tabela 4: Citotoxicidade frente à linhagem celular J774.A1 (CC<sub>50</sub>), atividade leishmanicida *in vitro* contra formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e *L. chagasi* (CI<sub>50</sub>) e índice de seletividade (IS) de chalconas.

CHALC	CC50 (µM)	CI50 LB-H3 (µM)	IS	CI50 LC (µM)	IS
D08	110,05 (69,21 - 174,99)	4,33 (3,75 - 5,00)	23	17,39 (12,87 - 23,49)	6,32
M10	652 (542,57 - 783,51)	0,13 (0,1 - 0,18)	2073	8,71 (8,24 - 9,2)	74,85
M15	373,03 (301,55 - 461,46)	3,94 (3,67 - 4,24)	94	10,05 (8,79 - 11,51)	37,11
M17	100,59 (77,19 - 131,08)	4,14 (3,96 - 4,32)	24	19,36 (15,38 - 24,36)	5,19
M20	168,5 (149,55 - 189,85)	4,04 (3,13 - 5,22)	42	6,56 (5,09 - 8,45)	25,68
M30	302,64 (268,99 - 340,51)	0,34 (0,26 - 0,44)	890	1,33 (1,25 - 1,42)	227
M33	43,13 (18,8 - 98,94)	4,69 (4,56 - 4,82)	9	19,37 (16,73 - 22,42)	2,22
J09	262,01 (206,00 - 333,26)	3,08 (2,72 - 3,5)	85,06	17,39 (12,87 - 23,49)	45,97
ANF	29,69 (23,21 - 37,97)	0,24 (0,16 - 0,36)	124	0,14 (0,1 - 0,2)	212

Os resultados representam a média de três experimentos independentes, realizados em triplicata, com intervalo de confiança de 95%. O índice de seletividade (IS) refere-se à razão CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub> para cada composto; ANF = Anfotericina B.

Tabela 5: Citotoxicidade frente à macrófagos de medula murinos ( $CC_{50}$ ), atividade leishmanicida *in vitro* contra formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e *L. chagasi* ( $CI_{50}$ ) e índice de seletividade (IS) de chalconas.

CHALC	$CC_{50}$ ( $\mu$ m)	$CI_{50}$ LB-H3 ( $\mu$ m)	IS	$CI_{50}$ LC ( $\mu$ m)	IS
<b>M10</b>	570,85 (527,95 – 617,23)	6,5 (6,19 – 6,83)	87,69	8,07 (6,99 – 9,31)	70,73
<b>M15</b>	271,47 (231,60 – 318,22)	4,29 (4,15 – 4,44)	63,28	4,63 (4,53 – 4,74)	58,63
<b>M30</b>	200,22 (174,30 – 230,00)	2,22 (1,71 – 2,90)	90,19	2,4 (1,87 – 3,04)	83,42
<b>J09</b>	468,05 (432,05 – 507,06)	5,46 (5,36 – 5,56)	85,72	8,72 (8,12 – 10,34)	53,54
<b>ANF</b>	28,96 (27,62 – 30,36)	0,16 (0,13 – 0,21)	181	0,12 (0,08 – 0,18)	241,33

Os resultados representam a média de dois experimentos independentes, realizados em triplicata, com intervalo de confiança de 95%. O índice de seletividade (IS) refere-se à razão  $CC_{50}/CI_{50}$  para cada composto; ANF = Anfotericina B.

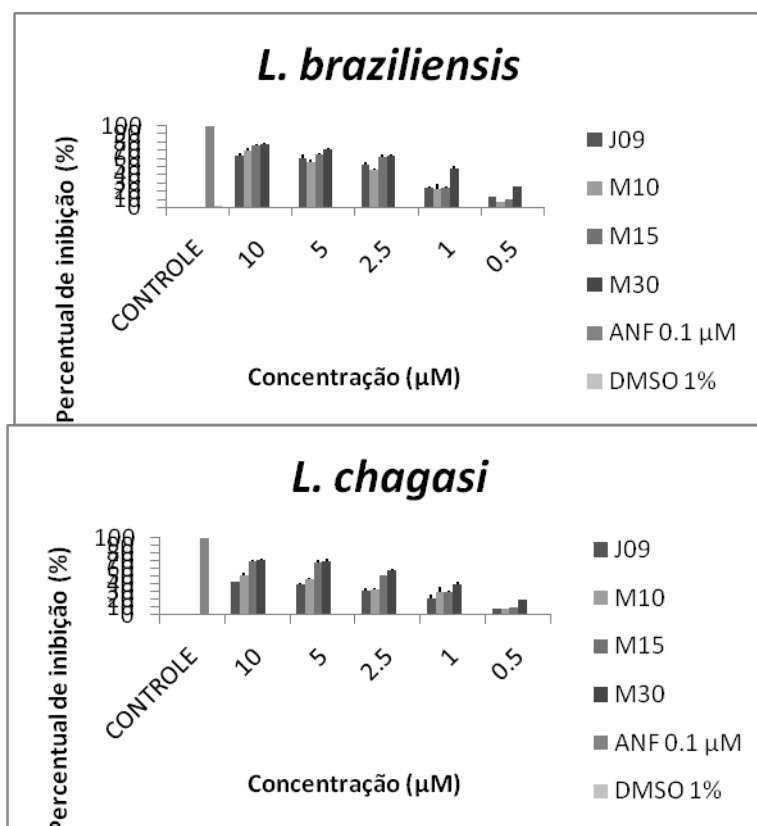


Figura 8: Avaliação da atividade leishmanicida das chalconas contra formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e *L. chagasi* em macrófagos murinos derivados de medula óssea. Os resultados foram obtidos pela contagem de amastigotas intracelulares em 500 células infectadas, representado a média de três experimentos independentes, realizados em triplicata, com intervalo de confiança de 95%.

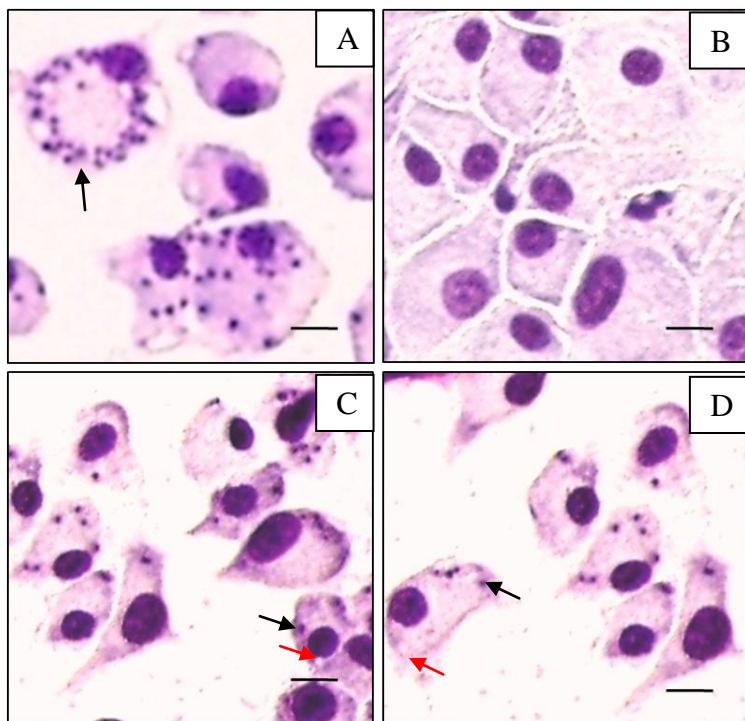


Figura 9: Resultados representativos da avaliação microscópica de macrófagos murinos infectadas com *L. braziliensis* coradas pelo Giemsa após 48 horas de infecção: (A) Controle negativo sem composto leishmanicida e presença de 1% DMSO; (B) Controle positivo tratamento com Anfotericina B na concentração de  $1\mu\text{M}$ ; (C) Tratamento com M10 na concentração de  $10\mu\text{M}$ ; (D) Tratamento com M30 na concentração de  $100\mu\text{M}$ . As setas pretas apontam os amastigotas dentro dos vacúolos parasitóforos; as setas vermelhas apontam os vacúolos parasitóforos vazios. A barra representa  $10\mu\text{m}$ .



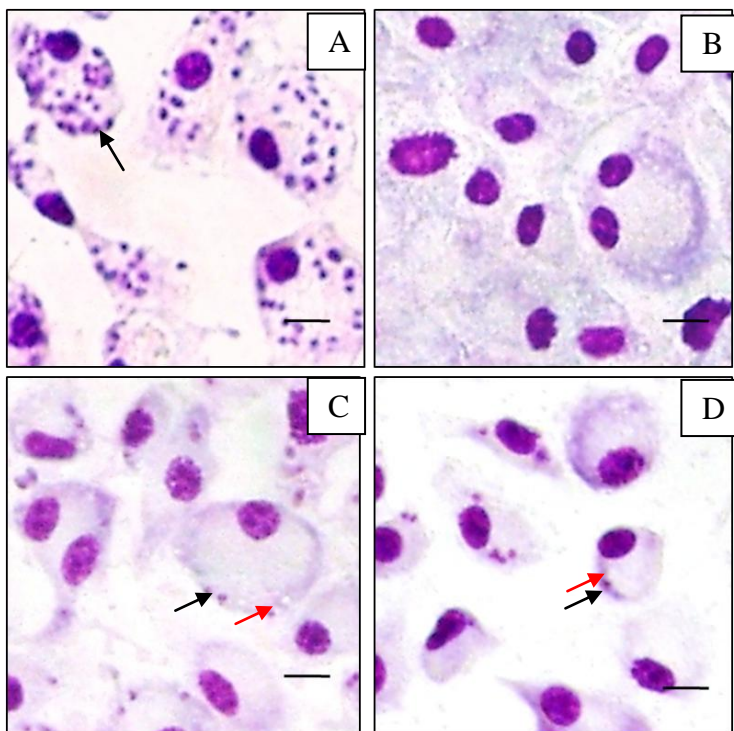


Figura 10: Resultados representativos da avaliação microscópica de macrófagos murinos infectadas com *L. chagasi* coradas pelo Giemsa após 48 horas de infecção: (A) Controle negativo sem composto leishmanicida e presença de 1% DMSO; (B) Controle positivo tratamento com Anfotericina B na concentração de 1 $\mu$ M; (C) Tratamento com M10 na concentração de 10 $\mu$ M; (D) Tratamento com M30 na concentração de 100 $\mu$ M. As setas pretas apontam os amastigotas dentro dos vacúolos parasitóforos; as setas vermelhas apontam os vacúolos parasitóforos vazios. A barra representa 10 $\mu$ m.

## 5.2 Clonagem da Tripanotiona Redutase de *Leishmania braziliensis*

### 5.2.1 Obtenção da sequência

A análise de PCR-RFLP do fragmento de kDNA, visando a geração de padrões de restrição do DNA do cinetoplasto específicos às diferentes espécies de *Leishmania*, confirmou a identidade da cepa H3 como *L. braziliensis*, uma vez que a cepa analisada apresentou padrão de restrição idêntico ao da cepa controle desta espécie, conforme figura 11.

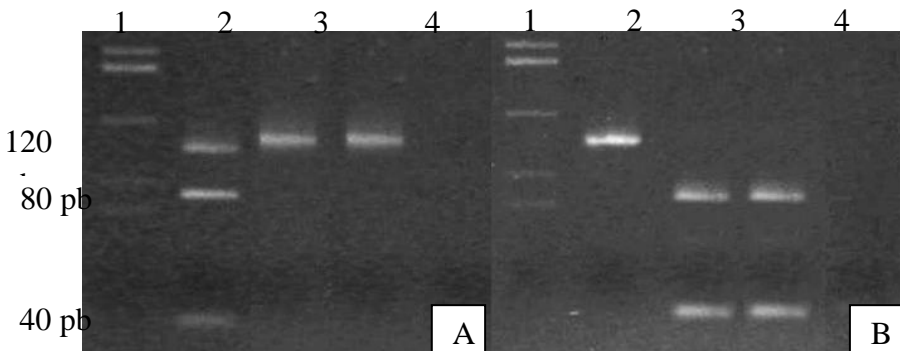


Figura 11: Perfil de PCR-RFLP de cepas de *Leishmania* sp. com as enzimas de restrição *AvaI* (A) e *HaeIII* (B). As canaletas correspondem: 1. marcador de peso molecular (fago lambda digerido com *EcoRI*); 2. *L. amazonensis* cepa 575; 3. *L. braziliensis* cepa L2904; 4. *L. braziliensis* cepa H3; 5. Controle negativo

Com o intuito de determinar a temperatura ótima para ligação específica dos iniciadores ao gene da *LbTR*, foram testadas temperaturas variando de 55°C (temperatura média

estimada pelo programa *Primer Select*) até 70°C (Figura 12). Uma banda isolada, de tamanho aproximado aos 1550pb teoricamente esperados para o gene da *LbTR*, foi melhor obtida quando se utilizou a temperatura de 63°C para ligação dos iniciadores. Para aperfeiçoar a resolução da amplificação, a reação foi realizada utilizando diferentes concentrações salinas do tampão (pH 6.5, 7.2 ou 8.8; MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM ou 3.5 mM; KCl 25 mM ou 75mM). A condição do tampão 8 (pH 8.8, MgCl<sub>2</sub> 3.5 mM e KCl 75mM) apresentou a melhor resolução do produto da amplificação na eletroforese em gel de agarose 1%, conforme figura 13.

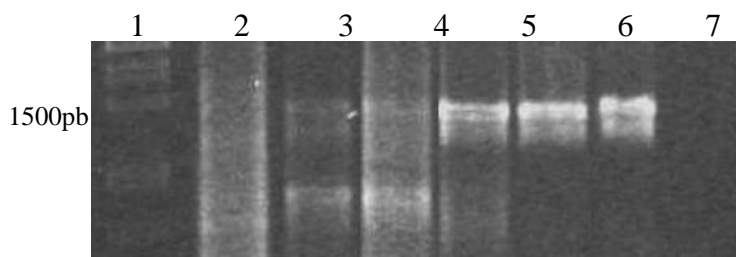


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose a 1%, corado por brometo de etídeo, revelando o produto de amplificação de 1550pb em um gradiente de 55° C a 65° C para ligação dos iniciadores. 1. Padrão de peso molecular (Fago lambda digerido com *HindIII*); 2. TA 55° C; 3. TA 57° C; 4. TA 59° C; 5. TA 61° C; 6. TA 63° C; 7. TA 65° C; 8. Controle negativo.

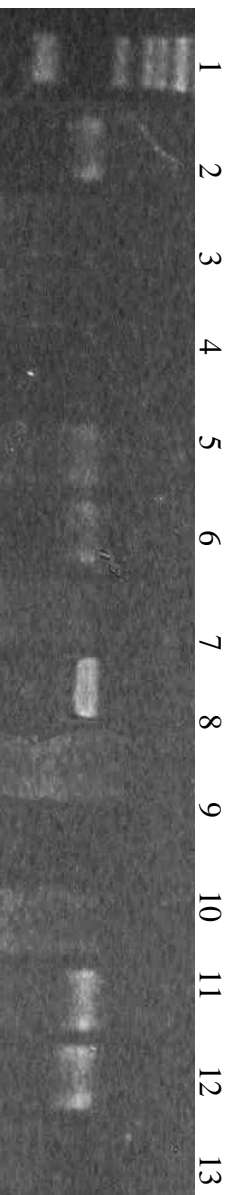


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo revelando o produto de amplificação de 1550pb do gene da *LbTR* em diferentes condições salinas. 1. Padrão de peso molecular (fago lambda digerido com *Hind*III); 2. Tampão 1 (pH6.8, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl); 3. Tampão 2 (pH6.8, 3.5mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl); 4. Tampão 3 (pH6.8, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl); 5. Tampão 4 (pH6.8, 3.5mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl); 6. Tampão 5 (pH8.8, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl); 7. Tampão 6 (pH8.8, 3.5mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl); 8. Tampão 7 (pH6.8, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl); 9. Tampão 8 (pH6.8, 3.5mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl); 10. Tampão 9 (pH9.2, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl); 11. Tampão 10 (pH9.2, 3.5mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl); 12. Tampão 11 (pH9.2, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl); 13. Tampão 12 (pH9.2, 3.5mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl); 14. Controle positivo, tampão 10X Taq polimerase Promega e 1.5mM KCl; 15. Controle negativo.

A melhor condição da amplificação foi utilizada para a obtenção do fragmento de DNA utilizado nas clonagens em vetor pGEM T-easy, permitindo um grande aumento do número de cópias do gene em tempo reduzido, devido ao rápido crescimento das bactérias transformadas (Figura 14).

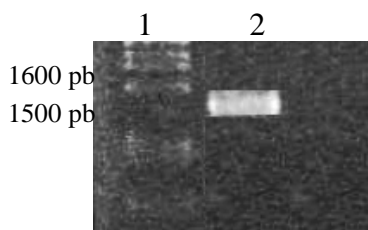


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado por brometo de etídeo revelando o produto de amplificação de 1550pb. 1. marcador de peso molecular (fago lambda digerido com *Hind*III); 2: amostra; 3. controle

O plaqueamento de bactérias *E. coli* DH5 transformadas com plasmídios pGEM contendo o gene da TR de *L. braziliensis* resultou em cerca de 100 colônias positivas para o inserto. Dessas, quinze foram avaliadas por PCR de colônia, confirmando-se a presença do inserto em 14 delas (Figura 15). Essas colônias foram crescidas em meio líquido, submetidas à extração do DNA plasmidial e posteriormente sequenciadas.

O sequenciamento da amostra gerou uma sequência de 1622 nucleotídeos, a qual corresponde à sequência do gene da proteína acrescida de parte do plasmídeo. A análise qualitativa da sequência nucleotídica através do pacote Phred/Phrap/Consed, confirmou a confiabilidade do sequenciamento, por possuírem valor de *Phred* acima de 20.

De acordo com o programa *ProtParam*, a sequência obtida para a *LbTR* codifica para uma proteína de 490 aminoácidos, com tamanho aproximado de 53,5kDa e ponto isoeletrico teórico de 7.1. Em termos de composição

aminoacídica, o programa apontou a existência de 118 aminoácidos carregados (59 positivamente e 59 negativamente).

A comparação da sequência de aminoácidos predita a partir das sequências de nucleotídeos de organismos filogeneticamente relacionados através de *blastx* e *ClustalW* (Figura 16) mostraram a identidade da proteína como tripanotona redutase. As análises demonstraram que a sequência de aminoácidos apresenta 98% de similaridade com a TR de *L. braziliensis* depositada no GenBank (número de acesso: [XP\\_001561849.1](#)), 84,% de similaridade com a TR de *L. amazonensis* (número de acesso: EF583873) e 67% de similaridade com a TR de *Trypanosoma cruzi* (número de acesso: M38051.1).

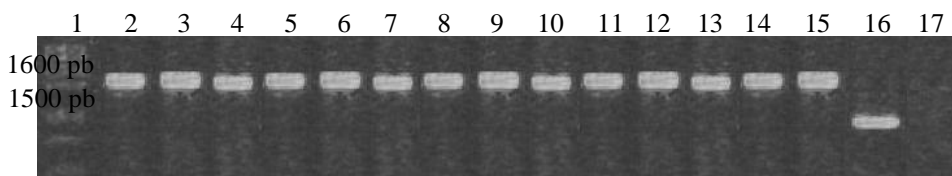


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado por brometo de etídeo revelando o produto de amplificação de 1550pb das colônias bacterianas positivas para o inserto do fragmento de DNA do gene da *LbTR* no plasmídio pGEM-T easy. 1. Marcador de peso molecular (fago lambda digerido com *HindIII*); 2 a 16. Amostras; 17. Controle negativo

LBH3 MMPRAYDLVVLGAGSGGLEAGWNAASYNNKKVAVVEVQKEHGPPCFAALGGTCVNVGCV 60  
 LB -MFRAYDLVVLGAGSGGLEAGWNAASYNNKKVAVVEAQAQKEHGPPCFAALGGTCVNVGCV 59  
 LA -MSRAYDPVVLGAGSGGLEAGWNAAVTYKKKVAIDVQATHGPPFAALGGTCVNVGCV 59  
 TC MMSKIFDLVVLGAGSGGLEAAWNAATLYKKRVAIDVQMVHGPPFFSALGGTCVNVGCV 60  
 \* . : \* \* \* : \*

LBH3 KKLMTGAQYMDLIRESCGFGWEMDRDSIRSNWKKLIAAKNKVSDINKSYTGMFDS 120  
 LB KKLMTGAQYMDLIRESCGFGWEMDRDSIRSNWKKLIAAKNKVSDINKSYTDMFENT 119  
 LA KKLMTGAQYMDLIRESGGFGWEMNRESLCPNWKTLIAAKNKVVNGINESYKSMFAD 119  
 TC KKLMTGAQYMEHLRESAGFGWEFDRITLRAEWKKLIAVKDEAVLNINKSYEEMFRD 120  
 \*

LBH3 LSFHMGFGALKDAHTVVVRKSEDPKSDVLETL EADYIL IATGSWPTRLIGPGDEL 180  
 LB LSFHMGFGALQDAHTVVVRKSEDPESDVLETL EADYIL IATGSWPTR-GIPGDEL 178  
 LA LSFHMGFGALQDAHTVVVRKSEDPNSDVLETL EYIL IATGSWPTRLIGVGFDEFC 179  
 TC LEFFLGWGSLESKNVVNVRESADPASAVKERLE TENILLASGSWPHMPNIPGIEHC 180  
 \* . \* . : \* \* \* : . . \*

LBH3 EAFYLDEAPKRALCVGGGYISVEFAGIFNAYKPPDGQVLCYRGEVILRGFDLEVRKSL 240  
 LB EAFYLDEAPKRALCVGGGYISVEFAGIFNAYKPPDGQVLCYRGEVILRGFDLEVRKSL 238  
 LA EAFYLEDAPKRMCLCVGGGYIAVEFAGIFNGYKPRGGYVLCYRGDPLRGFDTEVRKSL 239  
 TC EAFYLPEPRRRLTVGGGFIISVEFAGIFNAYKPKDGQVLCYRGEMILRGFDHTLREEL 240  
 \* \* \* \* \* : . \* \* \* \* \* : \*

LBH3 KQLEANGIKIRTKVNP SRITKNADGSKHVC FEDGEADYDQVMLAVGRAPRSKALQLDK 300  
 LB KQLEANGIKIRTKVNP SRITKNADGSKHVC FEDGEADYDQVMLAVGRAPRSKALQLDK 298  
 LA KQLGANGIRVRTNLNPTK ITKNEDGSHVHFNDGTEEDYDQVMLAIGRVP RSQALQLDK 299  
 TC KQLTANGIQILFKENPAKVELNADGSKSVTFESGKKMDFDLVMMAI GRSPRTKDLQLQ 300  
 \* \* \* \* \* : \* : \* \* \* : \* \* \* : \* \* : . \* : \* \* \* : \* \* \* : \* \* \* : \* \* \* : .

LBH3 GVKMGKNGAVVVDAYSKT SVDNIYAMGDVTDRLMLTPVAINEGS AFVETLFGCKPRATD 360  
 LB GVKMGKNGAVVVDAYSKT SVDNIYAGDVTDRMLTPVAINEGS AFVETLFGCKPRATD 358  
 LA GVQTKGNAGVQVDAYSKT SVDNIYAGDVTNRVMLTPVAINEGA AFVETVFGGKPRATD 359  
 TC GVMI-KNGGVQVDEYSRTNVSNIYAGDVTNRVMLTPVAINEAALVDTVFGTNRPKR 359  
 \*

LBH3 TKVACAVFSIPPIGTCGLTEEEAAKKYDVVAVYESSFTPLMHNISGSKHKTFMIRIVTKE 420  
 LB TKVACAVFSIPPIGTCGLTEEEAAKKYDVVAVYESSFTPLMHNISGSKHKTFMIRIVTKE 418  
 LA TKVACAVSSIPPIGTCGMTEEEAAKDHETVAVYESSFTPLMYNISGSKHKEFMIRITNQ 419  
 TC TRVASAVFSIPPIGTCGLEEVASKRYEVVAVYSSFTPLMHNISGSKYKTFVAKITNQ 419  
 \* . \*

LBH3 KDGEVLGVHMLGDSAP EIIQSVGICMKMGAKISDFHSTIGVHPTSAEELCSMRTPAYFY 480  
 LB KDGEVLGVHMLGDSAP EIIQSVGICMRMGAKISDFHSTIGVHPTSAEELCSMRTPAYFY 478  
 LA PTGEVLGVHMLGDSAP EIIQSVGICMKMGAKISDFHSTIGVHPTSAEELCSMRTPAYFY 479  
 TC SDGTVLGVHLLGDNAPEIIQGVGICLKLNAKISDFYNTIGVHPTS-AELCSMRTPSY 478  
 \*

LBH3 KGKRVRKTLQ--- 490  
 LB KGKRVKELSCNL- 490  
 LA RGKRVKELSSNL 492  
 TC KGKMEKPEASL 491  
 : \* : : . \* .

Figura 16: Alinhamento da estrutura primária da *LbTR* com as sequências aminoacídicas de tripanotiona redutase de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *T. cruzi*, depositadas no GenBank. LBH3: cepa H3 de *L. braziliensis*; LB: sequência de aminoácidos da tripanotiona redutase de *L. braziliensis* (número de acesso: [XP\\_001561849.1](#)); LA: sequência de aminoácidos da tripanotiona redutase de *L. amazonensis* (número de acesso: EF583873); TC: sequência de aminoácidos da tripanotiona redutase de *Trypanosoma cruzi* (número de acesso: M38051.1). Os asteriscos representam aminoácidos idênticos, e os pontos simples e duplos representam aminoácidos diferentes nas sequências preditas.



### 5.2.2 Expressão, purificação e avaliação da atividade enzimática de *LbTR* e do efeito inibitório das chalconas

Uma das colônias positivas obtida na fase anterior foi utilizada para a subclonagem do gene da *LbTR* em vetor de expressão pet14B, inserido em *E. coli* BL21 (DE3). Apenas uma das oito colônias obtidas teve o inserto confirmado pela reação de amplificação (Figura 17). Através do programa *Translate* do pacote *Expasy*, foi predita a sequência de aminoácidos, confirmando a inserção do gene da TR no vetor pET14b na fase de leitura correta.

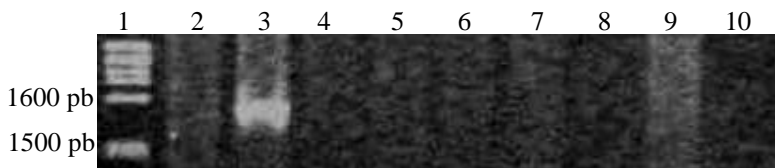


Figura 17: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado por brometo de etídeo revelando o produto de amplificação de 1550pb das colônias bacterianas positivas para o inserto do fragmento de DNA do gene da *LbTR* no plasmídio pET14b. 1. Marcador de peso molecular (fago lambda digerido com *HindIII*; 2 a 9. Amostras; 10. Controle negativo.

A eletroforese em gel de SDS-PAGE 12% das frações solúvel e insolúvel do lisado bacteriano das diferentes condições de indução da expressão heteróloga da proteína *LbTR* revelou que a maior parte da proteína foi expressa na fração insolúvel do lisado bacteriano (Figura 18-A). A confirmação por wester blot anti-cauda de histidina demonstrou que a melhor condição de expressão na fração solúvel, necessária a manutenção da atividade enzimática, ocorreu a 27°C por 6h. Através de western

blot anti-cauda de histidina foi identificada uma proteína de tamanho aproximado de 55kDa, correspondente ao tamanho teórico esperado (Figura 18-B).

A proteína foi expressa em 100mL nas condições padronizadas e a *LbTR* recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade em condições nativas da fração solúvel (Figura 19), com um rendimento de 133µg a partir dos 100mL de cultura. A atividade enzimática da *LbTR*, mensurada pelo consumo do DTNB no teste de Griess, foi mantida, conforme demonstrado na figura 19. Em uma concentração de 130ng por poço, a enzima manteve uma reação linear ( $r=0.9968$ ), cujo delta de absorbância foi de 0.011/min. Desta forma, esta concentração por poço foi utilizada para os ensaios de inibição.

As oito chalconas com maiores índices de seletividade foram testadas quanto à sua capacidade de inibir a atividade enzimática da tripanotiona redutase de *L. braziliensis* (Figura 20). Dois compostos (D08 e M17) apresentaram uma taxa de inibição de 41.6% e 36,5%, respectivamente, na concentração de 100µM. Os demais composto não apresentaram atividade inibitória. Por outro lado, os inibidores clomipramina, na concentração de 6,5µM, e ácido gálico, na concentração de 100µM, inibiram 85% e 93% da atividade enzimática da *LbTR* recombinante, respectivamente.

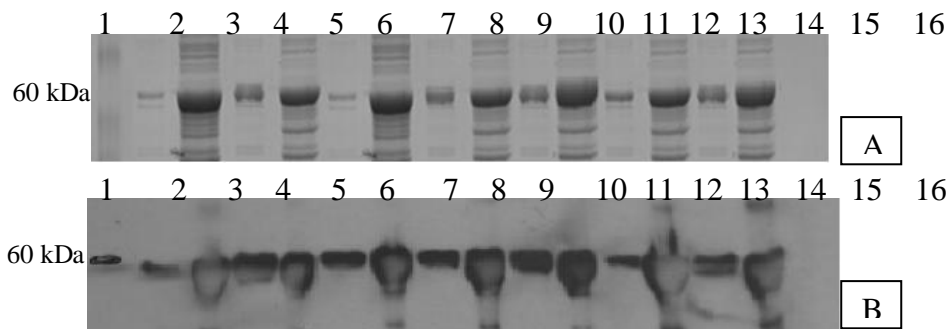


Figura 18: Teste de indução heteróloga da proteína recombinante *LbTR*. A. Gel de poliacrilamida desnaturante a 12%; B. Western Blot anti-cauda de histidina. 1. Marcador de tamanho molecular (*BenchMark™ Protein Ladder*, Invitrogen); 2. Fração solúvel do lisado da cultura crescida 15°C/6h; 3. Fração insolúvel do lisado da cultura crescida a 15°C/6h; 4. Fração solúvel do lisado da cultura crescida 15°C/12h; 5. Fração insolúvel do lisado da cultura crescida a 15°C/12h; 6. Fração solúvel do lisado da cultura crescida 27°C/3h; 7. Fração insolúvel do lisado da cultura crescida a 27°C/3h; 8. Fração solúvel do lisado da cultura crescida 27°C/6h; 9. Fração insolúvel do lisado da cultura crescida a 27°C/6h; 10. Fração solúvel do lisado da cultura crescida 27°C/12h; 11. Fração insolúvel do lisado da cultura crescida a 27°C/12h; 12. Fração solúvel do lisado da cultura crescida 37°C/3h; 13. Fração insolúvel do lisado da cultura crescida a 37°C/3h; 14. Fração solúvel do lisado da cultura crescida 37°C/6h; 15. Fração insolúvel do lisado da cultura crescida a 37°C/6h; 16. Controle negativo.

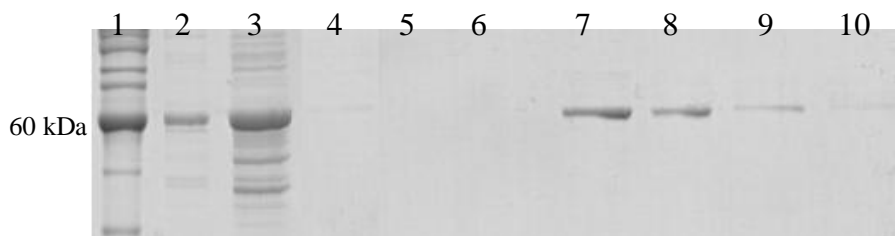


Figura 19: Análise da expressão heteróloga da proteína recombinante *LbTR* através de gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 12%, corado com Comassie Blue 250. 1. Padrão de Tamanho Molecular (*BenchMark™ Protein Ladder*, Invitrogen); 2. Fração solúvel após 6 horas da indução a 27°C; 3. Fração insolúvel após 6 horas da indução a 27°C; 4 a 6. Lavagens da coluna com tampão; 7 a 10. Eluatos da proteína com tampão de imidazol (proteína purificada).

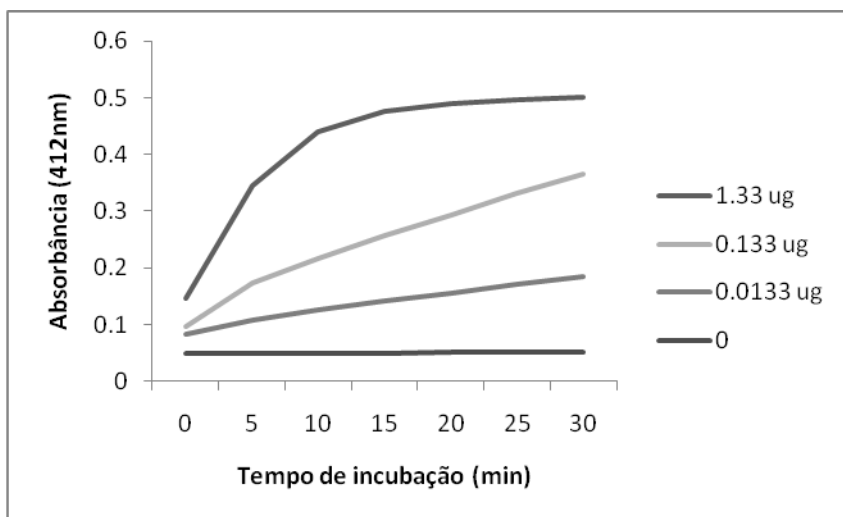


Figura 20: Teste de atividade da *LbTR* após a purificação e padronização da concentração enzimática para os ensaios de inibição. Os resultados representam a média de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

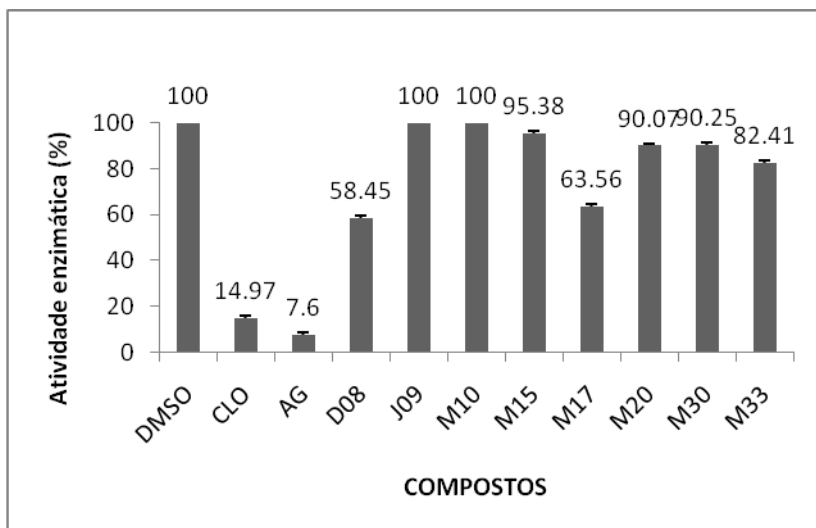


Figura 21: Efeito inibitório da *LbTR* por chalconas. Todos os compostos foram utilizados a 100 $\mu$ M. Os inibidores utilizados foram a clomipramina (CLO) (6,5  $\mu$ M) e o ácido gálico (AG) (100 $\mu$ M). Os resultados foram expressos em percentual de atividade enzimática após incubação com os compostos. Os resultados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

## 6. DISCUSSÃO

Embora distribuídas globalmente e causadoras de grande impacto sócio-econômico, as doenças tropicais afetam principalmente populações pobres de países em desenvolvimento e não são atrativas para a indústria farmacêutica (TROUILLER *et al.*, 2001; WHO, 2004). A organização mundial de Saúde (WHO) estima que um sexto da população mundial é afetada por doenças tropicais negligenciadas. As condições precárias de vida, a desorganização social, a falta de ações políticas efetivas e programas educacionais contribuem para a persistência destas doenças nas regiões mais pobres do mundo (CRUZ *et al.*, 2009).

Mesmo com o desenvolvimento da ciência nas últimas décadas e o sequenciamento do genoma humano, de vários patógenos de grande importância na saúde e de seus vetores, os avanços no conhecimento da biologia dos parasitos não são traduzidos ainda na interrupção da transmissão e no desenvolvimento de agentes quimioterápicos melhores.

A Leishmaniose é uma doença parasitária possível de ser controlada por um programa de vacinação, visto que, comparado com outros protozoários parasitos, o ciclo de vida da leishmania é relativamente simples, e a recuperação de uma infecção primária pode gerar resistência ao hospedeiro. Apesar dos estudos em modelos animais indicarem a possibilidade de imunização através de várias formulações vacinais, nenhuma das vacinas desenvolvidas até o presente tem sido aprovada em estudos clínicos (KEDZIERSKI, 2010).

Dada a falta de vacinas efetivas contra as leishmanioses, o controle da doença depende primariamente da quimioterapia (CRUZ *et al.*, 2009). O tratamento das leishmanioses dispõe de

poucos fármacos com muitas limitações, como altos custos, toxicidade, vias de administração e eficácia reduzida em áreas endêmicas (KEDZIERSKI *et al.*, 2009). Além disso, os antimoniais pentavalentes, fármacos de primeira escolha, requerem longos períodos de tratamento e em geral apresentam muitos efeitos colaterais (NIELSEN *et al.*, 1998; MURRAY *et al.*, 2005; CRUZ *et al.*, 2009). A resistência aos antimoniais, reportada na Índia e no Sudão em pacientes co-infectados com HIV, aumenta a dificuldade de estabelecer um tratamento eficiente às leishmanioses (DAVIES *et al.*, 2003).

A pesquisa de novos fármacos é um processo longo e oneroso, que requer o envolvimento de equipes multidisciplinares e necessita de investimentos vultuosos. Estima-se que, em média, um investimento de US\$ 500.000,00 e pelo menos doze anos de pesquisa são necessários para se ter um novo fármaco em fase de testes clínicos (FREARSON *et al.*, 2007).

Diversas classes químicas de moléculas obtidas a partir de produtos naturais ou sintéticos vêm sendo estudadas quanto às suas propriedades antiparasitárias. Dentre estes grupos, as chalconas têm sido apontadas como moléculas protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos.

As chalconas são compostos quimicamente designadas como cetonas  $\alpha,\beta$  - insaturadas com dois anéis aromáticos, um ligado diretamente à função cetona (anel A) e outro à dupla ligação (anel B) (BUZZI, 2007). Estes compostos podem ser obtidos de fontes naturais ou sinteticamente através de reações de condensação aldólica. Diferentes estudos têm demonstrado que várias chalconas e seus derivados possuem grande aplicabilidade biológica, apresentando importantes propriedades farmacológicas, destacando-se a atividade antiinflamatória,



antinociceptiva, antitumoral, antiviral, antibacteriana, antiprotozoária, entre outras (TORRES-SANTOS *et al.*, 1999; LUNARDI *et al.*, 2003; ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2009).

Dentre as chalconas ativas contra diferentes espécies de *Leishmania*, aquelas que contêm grupamentos metoxila em um dos anéis são referenciadas como moléculas muito promissoras (TORRES-SANTOS *et al.*, 1999; ROSSI-BERGMANN *et al.*, 2004; BOECK *et al.*, 2006; CHIARADIA, 2006).

No presente estudo, a avaliação da atividade leishmanicida de 71 chalconas trimetoxiladas, mostrou que 35 delas (50%) apresentaram atividade leishmanicida e, dentre elas, oito mostraram-se altamente seletivas contra formas promastigotas de *L. braziliensise* *L. chagasi*, com índices de seletividade maiores que 20.

A primeira chalcona metoxilada, a 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-chalcona, foi isolada de inflorescências da planta *Piper aduncum*, e sua atividade leishmanicida (CI<sub>50</sub>) *in vitro* contra promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis* foi de 2.2 µg/mL e 24µg/mL, respectivamente (TORRES-SANTOS *et al.*, 1999). Sua atividade seletiva foi comprovada através de testes de citotoxicidade em macrófagos murinos, que não foram afetados, mesmo em concentrações elevadas (100µg/mL). Pela simplicidade estrutural, a 2',6'-dihidroxi - 4'- metoxi - chalcona tornou-se um modelo de síntese para novas chalconas.

Dentre as estruturas similares à 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-chalcona, uma série de dezoito chalconas sintéticas derivados da xantoxilina (2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona), teve sua atividade seletiva testada *in vitro* também contra promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania*

*amazonensis*, onde as estruturas contendo grupamento flúor na posição 4 do anel B, ou nitro nas posições 3 ou 4 do anel B apresentaram excelente atividade (ROSSI-BERGMANN *et al*, 2004; BOECK *et al*, 2006).

Modificações na estrutura da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona geraram a 2,4,6-trimetoxi-acetofenona e seus derivados (CHIARADIA *et al.*, 2008). Alguns desses compostos apresentaram atividade leishmanicida significativa, com reduzida citotoxicidade contra macrófagos murinos (CHIARADIA, 2006).

No presente estudo, analisando as estruturas dos compostos ativos, constatou-se que a presença de grupos doadores de elétrons, como grupamentos metoxi e hidroxila, no anel A e grupos retiradores de elétrons, como halogênios e grupamento nitro, no anel B favorecem a atividade leishmanicida da chalcona. Chalconas com os grupamentos metoxila nas posições 3, 4 e 5 do anel A (série M) foram proporcionalmente mais ativas contra promastigotas de *Leishmania* sp. que as demais séries analisadas, uma vez que 75% dos compostos da série M foram ativos. Esses resultados sugerem que as posições das metoxilas no anel A favorecem a ligação específica da chalcona em seu alvo de ação, uma vez que a chalcona M20, possuidora dos mesmos substituintes no anel B, apresentou atividade leishmanicida (CI<sub>50</sub> 4.44µM para *L. braziliensis* e 28.94µM para *L. chagasi*, muito próxima da 3,4,5-trimetoxi-chalcona não substituída M17 (CI<sub>50</sub> 2.7µM para *L. braziliensis* e 3.25 µM para *L. chagasi*)). Por outro lado, as chalconas da série M que apresentaram maiores índices de seletividade (M15 e M30) possuem grupamentos NO<sub>2</sub> e CF<sub>3</sub> na posição 3 do anel B.

Boeck *et al.* (2006) estudando chalconas substituídas derivadas da DMC, observaram que o composto dimetilado no anel A e com grupo nitrato como substituinte na posição 3 do anel B apresentou maior atividade e seletividade contra promastigotas de *L. amazonensis* ( $CI_{50} = 0.7\mu M$ ).

Aponte e colaboradores (2010) observaram em seu estudo a alta seletividade do composto 2,4-dimetoximetil chalcona contendo um grupamento metoxila na posição 4 da anel B, tanto para formas promastigotas ( $CI_{50}=1.3\mu M$ ), quanto para formas amastigotas ( $CI_{50}=12.1\mu M$ ). Gaspar-Silva (2008), analisando sulfonamidas-4-metoxi-chalconas, observou que tanto substituintes aceptores de elétrons como também doadores de elétrons na posição 4 aumentam a atividade leishmanicida relativa dos compostos em relação ao seu análogo não substituído. A atividade relacionada a substituintes na posição 4 do anel B também foi verificada no presente trabalho, visto vez que o composto M10 apresentou  $CI_{50}$  de  $23.59\mu M$  e  $25.6\mu M$  para *L. braziliensis* e *L. chagasi*, respectivamente, correspondendo a índices de seletividade de 27.64 e 25.46.

O ciclo de vida das leishmanias apresenta duas formas evolutivas habitando hospedeiros diferentes; a forma promastigota flagelada encontra-se no tubo digestivo do inseto vetor, enquanto que formas amastigotas são encontradas no interior de células fagocitárias do hospedeiro vertebrado. Além de diferenças morfológicas estas formas do parasito expressam um repertório variado de proteínas e enzimas em suas membranas celulares, tipo e quantidade de enzimas respiratórias e resistência a ambientes ácidos (CUNNINGHAM, 2002; MURRAY *et al.*, 2005).

Essas diferenças morfológicas e metabólicas podem ser responsáveis pelas diferenças na sensibilidade entre as diferentes

formas do parasito frente aos fármacos reportadas na literatura (ALVES *et al.*, 2003; MORAIS-TEIXEIRA *et al.*, 2008) .

Além disso, a atividade contra formas intracelulares requer outras características do composto, visto que além de diferenças no metabolismo há também necessidade do composto atravessar diferentes sistemas de membranas e atingir o meio intracelular em concentrações adequadas. Considerando que o estágio de amastigota é a forma do parasito clinicamente relevante, testes de atividade contra essas formas são de elevada importância para a pesquisa bioguiada com vistas ao desenvolvimento de novos fármacos.

O estabelecimento de modelos de estudo contra formas intracelulares requer o uso de linhagens de células permissivas e o preparo do estágio específico do parasito. A padronização das condições de diferenciação do parasito variam de espécie para espécie, o que muitas vezes demanda a investigação de diferentes meios de cultura, temperatura, condições de pH e inóculo. Balanco *et al.* (1998) obtiveram amastigotas axênicos de *L. braziliensis* através do cultivo em meio modificado (UM54) pH 6.3 com adaptação gradual (aumento de 1°C por semana) na temperatura de cultivo dos parasitos, chegando a 34°C. Os autores relatam considerável perda de viabilidade na cultura e a necessidade de 10 subcultivos para obtenção dos amastigotas axênicos.

Teixeira *et al.* (2002) descrevem a diferenciação de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em amastigotas através da variação simultânea de pH e temperatura e obtiveram culturas com altas taxas de amastigotas (aproximadamente 98%), mas verificaram que a partir do quinto dia de cultivo, para *L. braziliensis* e do segundo repique para *L. amazonensis*, as células apresentavam sinais de degeneração.

Gaspar-Silva (2008) obteve taxas de amastigogênese de 95% para *L. braziliensis* cultivada em meio Schneider pH 6.3 suplementado com 20% de SBF a 34°C por 48h e *L. amazonensis* cultivada em meio Schneider pH 5.5, nas mesmas condições. No presente estudo, o cultivo de *L. chagasi* na concentração de  $80 \times 10^6$  células/mL em meio Schneider pH 7.0 suplementado com 20% de SBF a 37°C por 48h, resultou em taxas de amastigogênese de 93% com viabilidade celular >90%.

O desenvolvimento e aprimoramento de técnicas de cultivo celular possibilitaram a redução significativa do uso do modelo animal, permitindo estudos em maior escala e com quantidades relativamente pequenas de compostos. Neste sentido, diferentes modelos e linhagens celulares de propagação *in vitro* vêm sendo utilizadas na investigação da atividade leishmanicida intracelular. Contudo, estes modelos são limitados e não reproduzem as condições encontradas *in vivo* e, portanto, os resultados devem ser interpretados com cautela.

Ademais, a utilização de linhagens proliferativas na avaliação da atividade antiparasitária intracelular pode levar a valores subestimados da taxa de infecção, devido à característica da proliferação da célula hospedeira. Desta forma, a utilização de células primárias do sistema monofagocítico, que apresentam baixa replicação celular *in vitro* e são hospedeiras naturais de vários patógenos, incluindo *Leishmania* sp., são modelos de estudo mais adequados para avaliação de atividade antiparasitária. A padronização do cultivo de macrófagos murinos derivados de medula óssea em nosso laboratório permitiu não somente o estabelecimento de um modelo mais adequado para avaliação da infecção celular, mas também permite avaliar outras características como, por exemplo, a

ativação ou inibição de vias microbicidas, tais como produção de radicais livres e citocinas TNF e IFN (EGER, 2010).

Neste trabalho, as chalconas com maiores índices de seletividade foram avaliadas quanto à sua atividade específica contra formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e *L. chagasi* em dois modelos celulares.

Nos experimentos com amastigotas intracelulares na linhagem celular J774.A1, observou-se uma maior sensibilidade dos amastigotas de *L. braziliensis* aos compostos, sugerindo que a forma dermatrópica da leishmaniose é mais sensível, neste modelo. Os resultados mostraram uma elevada atividade específica de quatro das oito chalconas avaliadas. As chalconas M10 ( $CI_{50} = 0.13\mu M$ ) e M30 ( $CI_{50} = 0.34\mu M$ ) apresentaram índices de seletividade de 2073 e de 890, respectivamente, contra *L. braziliensis*. Estes mesmos compostos testados contra *L. chagasi* (forma viscerotrópica) mostraram ( $CI_{50}$  M10 =  $8.71\mu M$  e  $CI_{50}$  M30 =  $1.33\mu M$ ), porém com índices de seletividade menos expressivos (74.85 e 227, respectivamente).

Contrariamente, a avaliação das mesmas quatro chalconas (M10, M15, M30 e J09) em modelo de macrófagos murinos infectados com as mesmas espécies de *Leishmania* mostraram índices de seletividade elevados  $>50$  e  $CI_{50}$  muito semelhantes para as duas espécies, diferentemente do observado para a linhagem J774.A1.

A falha terapêutica da leishmaniose visceral frente aos antimoniais requer atenção visto que além das variações geográficas e de severidade da doença, do regime de tratamento, a sensibilidade das espécies de *Leishmania* também é variável (DAVIES *et al.*, 2003). Alves e colaboradores (2003), estudando a atividade leishmanicida *in vitro* de compostos derivados de diaril demonstravam uma maior resistência de *L. chagasi* ao

tratamento com a maioria dos compostos, quando comparada a *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Moraes-Teixeira *et al.* (2008), em um estudo comparando a atividade de Glucantime – Aventis e antimoniato de meglumina produzidos na Fiocruz observaram uma maior resistência de amastigotas intracelulares de *L. chagasi* ao tratamento ( $CI_{50} = 127.6 \mu\text{g/mL}$  e  $26.3 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente) que a mesma forma do parasito em *L. amazonensis* ( $CI_{50} = 22.9 \mu\text{g/mL}$  e  $15.4 \mu\text{g/mL}$ ) e *L. braziliensis*  $24.2 \mu\text{g/mL}$  e  $12.1 \mu\text{g/mL}$ ).

As chalconas são descritas como uma classe promissora de novos agentes leishmanicidas, mas pouco se sabe sobre seu mecanismo de ação. Cheng *et al.* (2001), estudando o mecanismo de ação da licochalcona A observaram que este composto tem a capacidade de inibir a atividade de duas enzimas mitocondriais, fumarato redutase e succinato desidrogenase. Estudos utilizando a DMC, mostraram que o composto foi incapaz de inibir a atividade das enzimas tripanotona redutase e da fumarato redutase de *Leishmania* (TORRES-SANTOS *et al.*, 2009). Neste mesmo estudo, os autores mostraram que culturas de *Leishmania* tratadas com diferentes concentrações deste composto apresentaram alterações significativas na biossíntese dos esteróis, sugerindo uma possível ação do composto nesta via (TORRES-SANTOS *et al.*, 2009). Da mesma forma, Rossi-Bergmann e colaboradores (2004), estudando a atividade de chalconas dimetoxiladas derivadas da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetifenona, demonstraram que estes compostos atuam na via de biossíntese de esteróis de membrana dos protozoários.

Uma das estratégias promissoras para o desenvolvimento de novos antiparasitários depende da exploração das diferenças metabólicas entre o patógeno e o hospedeiro (PEREZ-PINEIRO

*et al.*, 2009). Diversas substâncias, direcionadas para a inibição de vias metabólicas vitais e específicas do parasito, estão sendo testadas como quimioterápicos leishmanicidas (SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004).

O sistema redox de defesa dos mamíferos, baseado na dupla glutatona/glutationa redutase, é substituído nos tripanossomatídeos por um sistema análogo, mas distinto, baseado na tiol-poliamina conjugada tripanotiona e na flavoenzima tripanotiona redutase (PEREZ-PINEIRO *et al.*, 2009).

A tripanotiona redutase é uma enzima análoga à glutatona redutase, presente nos tripanossomatídeos. Além de exercer uma função fundamental para o parasito, mantendo um ambiente redutor, a TR apresenta uma significativa diferença em relação à glutatona redutase, que a torna um alvo terapêutico bastante interessante. Dentre as diferenças entre a TR e a GR, estão relacionadas o tamanho, carga e distribuição dos bolsões hidrofílicos/hidrofóbicos (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Recentemente foi demonstrado que o 2,5-bis-(4-acetilaminofenil) furano é capaz de inibir a atividade da TR, sendo que se esperava que a substituição dos radicais por grupos que possibilitassem as ligações de hidrogênio aumentasse a afinidade dos compostos pelo sítio ativo da TR (Oliveira *et al.*, 2008). Eger (2010) descreveu a atividade inibitória do ácido gálico para tripanotiona redutase de *Trypanosoma cruzi*, obtendo uma  $CI_{50}$  para inibição da TcTR de 45.57  $\mu M$ , resultado confirmado para a enzima de *Leishmania braziliensis* neste trabalho (dados não mostrados). O ácido gálico apresenta cinco grupamentos hidroxilas na sua estrutura, o que justificaria sua atividade inibitória pelas interações de hidrogênio com o sítio ativo.



Analizando a atividade inibitória das oito chalconas ativas contra *LbTR*, observamos que os compostos D08 e M17, na concentração de 100µM, foram capazes de inibir a atividade enzimática em 42% e 27%, respectivamente. Torres-Santos *et al.* (2009), já haviam demonstrado a incapacidade de chalconas metoxiladas inibirem a atividade enzimática da tripanotiona redutase de *Leishmania*. Stump e colaboradores (2008), estudando a atividade inibitória de compostos derivados de diaril sulfonas, que contem em seu esqueleto carbônico dois anéis aromáticos semelhantes às chalconas, observaram que estes compostos inibiam de 0 a 64% a atividade enzimática em uma concentração de 100µM. Oliveira *et al.* (2008), trabalhando com derivados de arilsulfanos, verificaram que essas moléculas inibem moderadamente a atividade da tripanotiona redutase (6% a 63%). Por outro lado, Saravanamuthu *et al.* (2004) obtiveram a inibição irreversível da atividade da tripanotiona redutase de *T. cruzi* de forma tempo dependente utilizando derivados de quinacrininas.

Visto que as chalconas estudadas não inibiram significativamente a atividade enzimática da *LbTR*, nem ativaram a via da óxido nítrico sintase de macrófagos, o mecanismo de ação das 3,4,5-trimetoxi-chalconas permanece não elucidado. As moléculas estudadas mostraram-se como moléculas promissoras para estudos mais detalhados visando novos agentes leishmanicidas, uma vez que algumas delas apresentaram atividades específicas elevadas. Além disso, o domínio da técnica de expressão heteróloga da *LbTR*, juntamente com a expressão da enzima de *T. cruzi* (EGER, 2010), evidencia um novo modelo de estudos de atividade de compostos ao grupo do Laboratório de Protozoologia.

## 7. CONCLUSÕES

- Oito das 71 chalconas avaliadas apresentaram atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. chagasi*;
- A diferenciação de *L. chagasi* em pH 7,0 a 37°C permitiu a obtenção de 90% de amastigotas infectivos;
- Os compostos da série M, caracterizados por apresentar grupamentos metoxila como substituintes nas posições 3, 4 e 5 do anel A foram os mais ativos e com maiores índices de seletividade;
- As chalconas M10 e M30 forma o composto mais ativos e mais seletivo, respectivamente, contra amastigotas intracelulares independente do modelo de célula hospedeira;
- As formas amastigotas de *L. braziliensis* mostraram-se mais sensíveis aos compostos que as amastigotas de *L. chagasi*;
- Nenhuma das chalconas promoveu a produção de óxido nítrico em macrófagos;
- A tripanotona redutase recombinante foi melhor expressa na fração solúvel, mantendo sua atividade e características bioquímicas, na cultura induzida a 27°C, por 6h, produzindo 133µg de proteína em 100mL de cultura;
- Apenas duas (D08 e M17) das oito chalconas ativas mostram uma atividade inibitória moderada da enzima *LbTR*.

## 8. REFERÊNCIAS

- ALVAR, J.; APARICIO, P.; ASEFFA, P.; BOER, M. D.; CAÑAVATE, C.; DEDET, J. GRADONI, L.; HOSRT, R.T., LÓPEZ-VÉLEZ, R.; MORENO, J. The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 2, p. 334-359, 2008.
- ALVES, L. V.; CANTO-CAVALHEIRO, M.M.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; LEON, L. *In Vitro* Antiproliferative Effects of Several Diaryl Derivatives on *Leishmania* spp. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 4, p. 453-456, 2003.
- ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; OLIVEIRA, K. N.; GASPAR-SILVA, D.; PACHECO, L.K.; JOUSSEF, A. C.; STENDEL, M.; SIMÕES, C.M.O.; SOUZA, A. M. T.; MAGALHÃES, U.O.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; NUNES, R.J.; CASTRO, H.C. Synthesis, biological evaluation and SAR of sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives with potential antileishmanial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 755-763, 2008.
- APONTE, J.C.; CASTILLO, D.; ESTEVEZ, Y.; CONZALES, G.; AREVALO, J.; HAMMOND, G.B.; SAUVAIN, M. In vitro and in vivo anti-Leishmania activity of polysubstituted chalcones. **Biorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 100-103, 2010.

ÁVILA, H.P. Atividade antibacteriana de chalconas. Florianópolis, 2008. 78 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGB, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

BAIOCCO, P.; FRANCESCHINI, S.; ILARI, A.; COLOTTI, G. Trypanothione reductase from *Leishmania infantum*: cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray data analysis. [Protein and Peptide Letters](#), v. 16, n. 2, p. 296-200, 2009.

BALANCO, J.M.F.; PRAL, E.M.F.; DA SILVA, S.; BIJOVSKY, A.T.; MORTARA, R.A.; ALFIERI, S.C. Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigote-like stages. **Parasitology**, v. 116, p. 103-113, 1998.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328 – 337, 2004.

BOECK, P.; FALCÃO, C.A.B.; LEAL, P.C.; YUNES, R.A.; FILHO, V.C.; TORRESSANTOS, E.C.; ROSSI-BERGMANN, B. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorganic Medical Chemistry**, v. 14, p. 1538-1545, 2006.

BOND, C. S.; ZHANG, Y.; BERRIMAN, M.; CUNNINGHAM, M.L.; FAIRLAMB, A.H.; HUNTER, W.

N. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. **Structure with Folding and Design**, v. 7, n. 1, p. 81 – 89, 1999.

BRENER, Z. Terapêutica Experimental na Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO (eds). ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 379-388. 2000.

BUZZI, F. C. Síntese de Novas moléculas com potencial terapêutico: imidas cíclicas, chalconas e compostos relacionados. Florianópolis, 2007. 193 p. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química – PPGQ, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

CASTRO-PINTO, D. B.; GENESTRA, M.; MENEZES, G. B.; WAGHABI, M.; GONÇALVES, A.; DEL CISTIA, C. De N.; SANT'ANA, C. ., R.; LEON, L. L.; MENDONÇA-LIMA, L. Cloning and expression of trypanothione reductase from a New World *Leishmania* species. **Archive in Microbiology**, v. 189, p.375–384. 2008.

CESARIN, D. S.; FERREIRA, J. N.; BRAZ, R. F. Efeito da substituição por átomos de flúor no equilíbrio conformacional de chalcona. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 604-611. 2001.

CHEN, M.; CHRISTENSEN, S.B.; BLOM, J.; LEMMICH, E.; NADELMANN, L.; FICH,K.; THEANDER, T.G.; KHARAZMI, A. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent

with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 37, n. 12, p. 2550-2556, 1993.

CHEN, M.; ZHAI, L.; CHRISTENSEN, S. B.; THEANDER, T.G.; KHARAZMI, A. Inhibition of Fumarate Reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by Chalcones. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 2023–2029, 2001.

CHIARADIA, L.D. Obtenção de chalconas sintéticas com potencial atividade biológica. Florianópolis, 2006. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química – PPGQ, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

CHIARADIA, L. D.; SANTOS, R.; VITOR, C.E.; VIEIRA, A.A.; LEAL, P.C.; NUNES, R.J.; CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A. Synthesis and pharmacological activity of chalcones derivad from 2,4,6-trimethoxyacetophenone in RAW 264.7 cells stimulated by LPS: Quantitative structure activity relationships. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 658-667, 2008.

COTA, B. B.; ROSA, L. H.; FAGUNDES, M. S.; MARTINS-FILHO, O. A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; ROMANHA, A. J.; ZANI, C. A. A potent trypanocidal component from the fungus *Lentinus strigosus* inhibits trypanothione reductase and modulates PBMC proliferation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 263-270. 2008.

- CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, p. 399-410, 2006.
- CRUZ, A.K.; TOLEDO, J. S.; FALADE, M.; TERRÃO, M.C.; KAMCHONWONGPAISAN, S.; UTHAIPIBULL, C. Current Treatment and Drug Discovery Against *Leishmania spp.* And *Plasmodium spp.*: A Review. **Current Drug Targests**, v. 10, p. 178-192, 2009.
- CUNNINGHAN, M.L.; FAIRLAMB, A.H. Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*. Purification, characterization and inhibition by trivalents antimonials. **European Journal of Biochemistry**, v. 230, n. 2, p. 460-468, 1995.
- CUNNINGHAM, A.C. Parasite adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, p. 132-141, 2002.
- DAVIES, C. R.; KAYE, P.; CROFT, S.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. **British Medical Journal**, v. 326, p. 377-382, 2003.
- DEDET, J. P.; PRATLONG, F. Leishmaniasis. In: COOK, G.C.; ZUMLA, A. (eds). **Manson's Tropical Diseases**. Londres: W.B. Saunders, p. 1339-1364. 2003.
- EGER, I. Potencial quimioterêutico de diferentes derivados do ácido gálico para o tratamento da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: avaliação *in vitro* e *in vivo*. Florianópolis, 2010. Tese (Doutorado em Biotecnologia) –

Programa de Pós Graduação em Biotecnologia – PPGB,  
Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

FAIRLAMB, A.H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. **Annual Review of Microbiology**, v. 46, p. 695-729, 1992.

FREARSON, J.A.; WYATT, P. G.; GILBERT, H.I.; FAIRLAMB, A.H. Target assessment for antiparasitic drug discovery. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 12, p. 589-595, 2007.

GASPAR-SILVA, D. Padronização do cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares de *Leishmania* spp. e análise da atividade leishmanicida de chalconas. Florianópolis, 2008. 120 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGB, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

GIRAULT, S.; DAVIOUD-CHARVET, T.E.; MAES, L.; DUBREMETS, J.F.; DEBREU, M.A.; LANDRY, V.; SERGHERAERT, C. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 837, n. 9, 2001.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. De L. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80. 2003.

GOTO, H. ANGELO, A. LINDOSO, L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis.



**Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.

GRISARD, E.C.; STEINDEL, M.; SHAW, J.J.; ISHKAWA, E.A.Y.; CARVALHO-PINTO, C.J.; EGER, I.; TOMA, H. K.; LIMA, J. H.; ROMANHA, A. J.; CAMPBELL, D. A. Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. **Acta Tropica**, v. 74, p. 89 – 93. 1999.

GUTTERIDGE, C.E.; VO, J.V.; TILLET, C.B.; VIGILANTE, J.A.; DETTMER, J.R.; PATTERSON, S.L.; WERBOVETZ, K.A.; CAPERS, J.; NICHOLS, D.A.; BHATTACHARJEE, A.K.; GERENA, L. Antileishmanial and antimalarial chalcones: Synthesis, efficacy and cytotoxicity of pyridinyl and naphthalenyl analogs. **Medicinal Chemistry**, v. 3, p. 115-119, 2007.

GURU, P.Y.; AGRAWAL, A.K.; SINGHA, U.K.; SINGHAL, A.; GUPTA, C.M. Drug targeting in *Leishmania donovani* infections using tuftsin-bearing liposomes as drug vehicles. **Federation of European Biochemical Societies**, v.2, n. 1, p.204-208, 1989.

HAMILTON, C. J.; SARAVANAMUTHU, A.; FAIRLAMB, A. H.; EGGLESTON, I. M. Benzofuranyl 3,5-bis-Polyamine Derivatives as Time-Dependent Inhibitors of Trypanothione Reductase. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 3683–3693. 2003.

KARPLUS, P.A.; SCHULZ, G.E. Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme:substrate crystal structures at 2.0 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 210, p. 163-180, 1989.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis vaccine: where are we today? **Journal of Global Infect Disease**, v. 2, n. 2, p. 177-185, 2010.

KEDZIERSKI, L.; SAKTHIANANDESWAREN, A.; CURTIS, J.M.; ANDREWS, P.C.; JUNK, P.C.; KEDZIERSKA, K. Leishmaniasis: Current Treatment and Prospects for New Drugs and Vaccines. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 599-614, 2009.

KO, H.H.; TSAO, L.T.; YU, K.L.; LIU, C.T.; WANG, J.P.; LIN, C.N. Structure-activity relationship studies on chalcone derivatives. the potent inhibition of chemical mediators release. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 105-11, 2003.

LAISON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazonense de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13-18, 2010.

LAKSHMI, V.; PANDEY, K.; KAPIL, A.; SINGH, N.; SAMANT, M.; DUBE, A. *In vitro* and *In vivo* leishmanicidal activity of *Dysoxylum binectariferum* and its fractions against *Leishmania donovani*. **Phytomedicine**, v.14, p. 36-42, 2007.

- LIMA, E B. De; PORTO, C.; MOTTA, J. O. C. Da; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 2, p. 111-124, 2007.
- LINDOSO, Lindoso, J.A.; Barbosa, R.N.; Posada-Vergara, M.P.; DUARTE, M.I.S.; OYAFUSO, L.K.; AMATO, V.S.; GOTO, H. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. **Brazilian Journal of Dermatology**, v. 160, p. 311–318, 2009.
- LIU, M.; WILAIRAT, P.; CROFT, S.L.; TAN, A.L.; GO, M.L. Structure-activity relationships of antileishmanial and antimalarial chalcones. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 13, p. 2729-38, 2003.
- LOOSDRECHT, A.A.; NENNIE, E.; OSSENKOPPELE, G.L.; BEELEN, R.H.; LANGENHUISEN, M.M. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. **Journal of Immunology Methods**, v. 141, n. 1, p. 15-22, 1991.
- LUNARDI, F.; GUZELA, M.; RODRIGUES, A.T.; CORRÊA, R.; EGER-MANGRICH, I.; STEINDEL, M.; GRISARD, E.C.; ASSREUY, J.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.S. Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1449-1451, 2003.

- MESQUITA, M.L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; PAULA, J.E. de; ESPINDOLA, L.S. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as tradicional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 110, p. 165 – 170, 2007.
- MICHALICK, M.S.M. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D.P. *et al.* **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 41-46.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2007.
- MISHRA, B. B.; KALE, R. R.; SINGH, R. K.; TIWARI, V. K. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. **Fitoterapia**, v. 80, p. 81-90. 2009.
- MORAES-TEIXEIRA, E. CARVALHO, A. S.; COSTA, J.C.S.; DUARTE, S.L.; MENDONÇA, J.S.; BOECHAT, N.; RABELLO, A. In vitro and in vivo activity of meglumine antimoniate produced at Farmanguinhos-Fiocruz, Brazil, against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L.(L.) chagasi* and *L.(Viannia) braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 358-362, 2008.
- MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, p. 1561-1577, 2005.

NI, L.; MENG, C.Q.; SIKORSKI, J.A. Recent advances in therapeutic chalcones. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 14, n. 12, p. 1669-1691, 2004.

NIELSEN, S. F.; CHRISTENSEN, S. B.; CRUCIANI, G.; KHARAZMI, A.; LILIEFORS, T. Antileishmanial Chalcones: Statistical Design, Synthesis, and three-dimensional quantitative structure – Activity relationship analysis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 4819-1832, 1998.

NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 125-137, 2007.

OLIVEIRA, R. B. DE; ZANI, C. L.; FERREIRA, R. S.; LEITE, R. S.; ALVES, T. M. A.; SILVA, T. H. A. DA; ROMANHA, A. J. Síntese, avaliação biológica e modelagem molecular de arilfuranos como inibidores da enzima tripanotona redutase. **Química Nova** v. 31, n. 2, p. 261-267, 2008.

PÉREZ-PIÑEIRO, R.; BURGOS, A.; JONES, D.C.; ANDREW, L.C.; RODRIGUEZ, H.; SUAREZ, M.; FAIRLAMB, A.; WISHART, D. Development of a Novel Virtual Screening Cascade Protocol to Identify Potential Trypanothione Reductase Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, p. 1670-1680, 2009.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M.N.; MARZAL, P. C.;

- ANDRADE JUNIOR, H. F.; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento de leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.
- ROSSI-BERGMANN, B.; TORRES dos SANTOS, E. C.; YUNES, R. A.; CECHINELFILHO, V.; BOECK, P. Preparation of chalcones for the treatment of parasitic diseases. Brazil **PI 0204079-4**, 2004. 40 pp.
- SALAY, L.C.; PROCOPIO, J.; OLIVEIRA, E.; NAKAIE, C.R.; SCHREIER, S. Ion channel-like activity of the antimicrobial peptide tritripticin in planar lipid bilayers. **FEBS Letters**, v. 565, p. 171–175. 2004.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning – a laboratory manual**. 3a edição, CSHJ PRESS. 2001
- SANTOS, D. O.; COUTINHO, C. E. R.; MADEIRA, M. F.; BOTTINO, C. G.; VIEIRA, R. T.; NASCIMENTO, S. B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S. C.; CORTE-REAL, S.; PINHO, R. T.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, 2008.
- SARAVANAMUTHU, A.; VICKERS, T.J.; BOND, C.S.; PETERSON, M.R.; HUNTER, W.N.; FAIRLAMB, A.H. Two Interacting Binding Sites for Quinacrine Derivatives in the Active Site of Trypanothione Reductase. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 28, p. 29493-29500, 2004.

SIEUWERTS, A.M.; KLIJN, J.G.M.; PETERS, H.A.; FOEKENS, J.A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: How to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell culture *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC50- values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 33, p. 813-823, 1995.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVO DE NOTIFICAÇÃO (SINAN), 2010.  
(<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>)

SOARES-BEZERRA,R.J.; LEON, L. GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 139-150, 2004.

SOTO, J., ARANA, B.A.; TOLEDO, J.; RIZZO, N. VEGA, J.C.; DIAZ, A.; LUZ, M.; GUTIERREZ, P.; ARBOLEDA, M.; BERMAN, J.D.; JUNGE, K.; ENGEL, J. SINDERMANN, H. Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 1266-1272, 2004.

STUMP, B.; EBERLE, C.; KAISER, M.; BRUN, R.; KRAUTH-SIEGEL, R.L.; DIEDERICH, F. Diaryl sulfide-based inhibitors of trypanothione reductase: inhibition potency, revised binding mode and antiprotozoal activities. **Organic Biomolecular Chemistry**, v. 6, p. 3935–3947, 2008.

- SUNDAR, S.; ROSENKAIMER, F.; MAKHARIA, M.K.; GOYAL, A. K.; MANDAL, A.K.; VOSS, A.; HILGARD, P.; MURRAY, H.W. Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. **The Lancet**, v. 352, p.1821-1823,1998.
- SUNDAR S.; JHA, T.K.; THAKUR, C.P.; ENGEL, J.; FISCHER, C.; JUNGE, K. BRYCESON, A.; BERMAN, J. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, p. 1739-1746, 2002.
- TAKAHASHI, M.; FUCHINO, H.; SEKITA, S.; SATAKE, M.; KIUCHI, F. *In vitro* Leishmanicidal constituents of *Millettia pendula*. **Chemical Pharmacology Bulletin**, v. 54, n. 6, p. 915 – 917, 2006.
- TEIXEIRA, M.C.A.; SANTOS, R.J.; SAMPAIO, R.B.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; DOS-SANTOS, W.L.C. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. **Parasitology Research**, v. 88, p. 963-968, 2002.
- TORRES-SANTOS, E.C.; MOREIRA, D.L.; KAPLAN, M.E.C.; MEIRELLES, M.N.; ROSSI-BERGMAN, B. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial agents ant chemotherapy**, v. 43, n. 5, p. 1234-1241, 1999.
- TORRES-SANTOS, E.C.; SAMPAIOS-SANTOS, M.I.; BUCKNER, F. S.; YOKOYAMAS, K.; GELB, M;

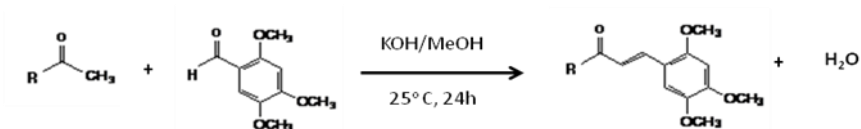


- URBINA, J.A.; ROSSI-BERGMANN, B. Altered sterol profile induced in *Leishmania amazonensis* by a natural dihydroxymethoxylated chalcone. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 469-472, 2009.
- TROUILLER, P.; TORREELE, E.; OLLIARO, P.L.; WHITE, N.; FOSTER, S.; WIRTH, D.; PÉRCOUL, B. Drugs for neglected diseases: a failure of the market and a public health failure? **Tropical Medicine and International Health.**, v. 6, n. 11, p. 945-51, 2001.
- VOLPINI, A.C.; PASSOS, V.M.; OLIVEIRA, G.C.; ROMANHA, A.J. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*)*braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing american cutaneous leishmaniasis. **Acta tropical**, v. 90, n. 1, p. 31-37, 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Life cycle of *Leishmania* sp. 2004. (<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/lifecycle.htm>)
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis. 2011. (<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>)
- ZHAI, L.; BLOM, J.; CHEN, M.; CHRISTENSEN, S. B.; KHARAZMI, A. The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 2742-2748. 1995.

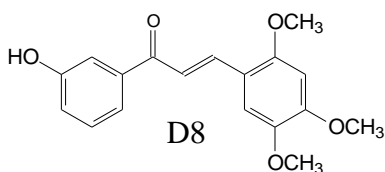
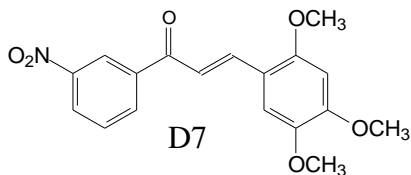
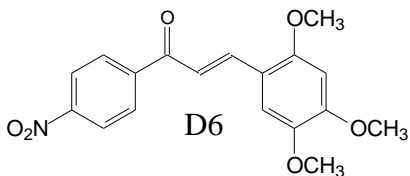
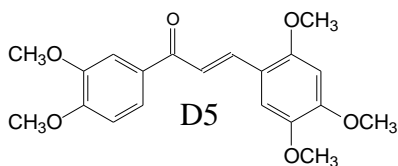
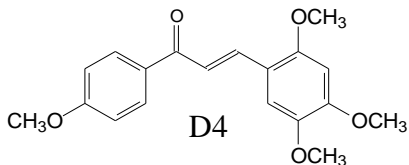
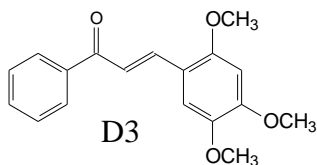
ZHAI, L.; CHEN, M. BLOM, J.; THEANDER, T. G.;  
CHISTENSEN, S.B.; KHARAZMI, A. The antileishmanial  
activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism  
of action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 43, p.  
793-803. 1999.

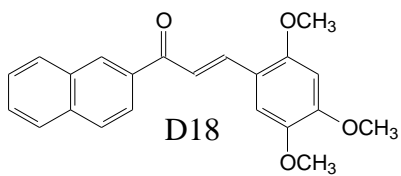
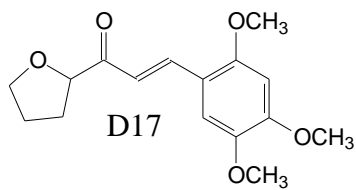
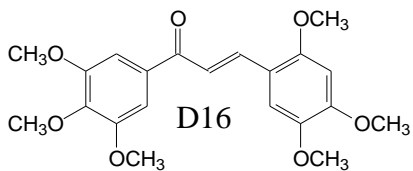
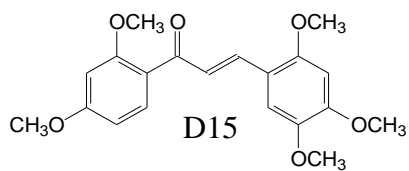
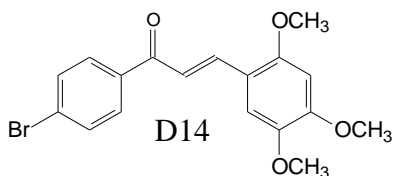
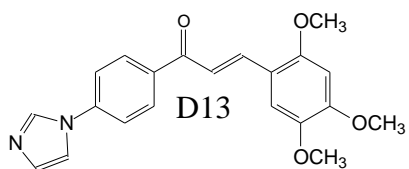
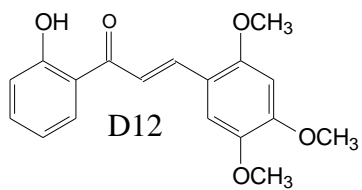
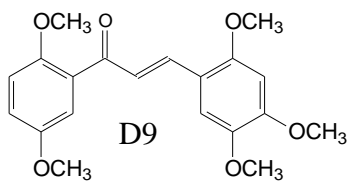
## APÊNDICE 1: CHALCONAS D: DERIVADAS DA 2,4,5 - TRIMETOXIBENZALDEÍDO

1. Reação básica de produção das chalconas da série D:



2. Estruturas das chalconas substituídas da série





### 3. Nomenclaturas das chalconas D, segundo IUPAC

D3: (2E) -1-fenil -3- (2,4,5-trimetoxifenil)-2-propen-1-ona

D4: (2E) -1- (4'-metoxifenil) -3- (2,4,5-trimetoxifenil)-2-propen-1-ona

D5: (2E) -1- (3',4'-dimetoxifenil) -3- (2,4,5-trimetoxifenil)-2-propen-1-ona

D6: (2E) -1- (4'-nitrofenil) -3- (2,4,5-trimetoxifenil)-2-propen-1-ona

D7: (2E) -1- (3'-nitrofenil) -3- (2,4,5-trimetoxifenil)-2-propen-1-ona

D8: (2E) -1- (3'-hidroxifenil) -3- (2,4,5-trimetoxifenil)-2-propen-1-ona

D9: (2E) -1- (2',5'-dimetoxifenil) -3- (2,4,5-trimetoxifenil)-2-propen-1-ona

D12: (2E) -1- (2'-hidroxifenil) -3- (2,4,5-trimetoxifenil)-2-propen-1-ona

D13: (2E) -1- (4'- (1H-imidazol-1-il) fenil) -3- (2,4,5-trimetoxifenil)-2-propen-1-ona

D14: (2E) -1- (4'-bromofenil) -3- (2,4,5-trimetoxifenil)-2-propen-1-ona

D15: (2E) -1- (2',4'- dimetoxifenil) -3- (2,4,5-trimetoxifenil)-2-propen-1-ona

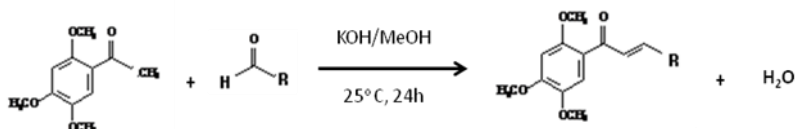
D16: (2E) -1- (3',4',5'- trimetoxifenil) -3- (2,4,5-trimetoxifenil)-2-propen-1-ona

D17: (2E) -1- (furan-2-il) -3- (2,4,5-trimetoxifenil)-2-propen-1-ona

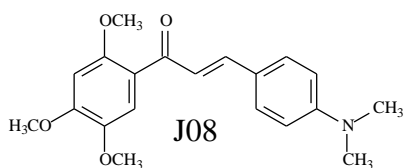
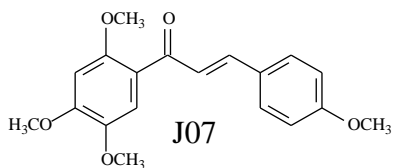
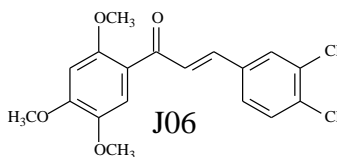
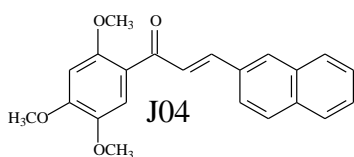
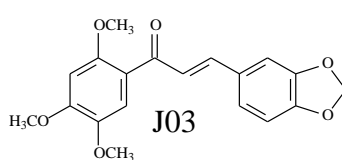
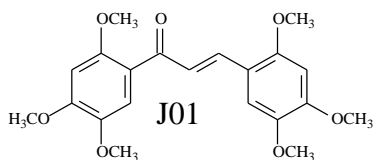
D18: (2E) -1- (2'- naftil) -3- (2,4,5-trimetoxifenil)-2-propen-1-ona

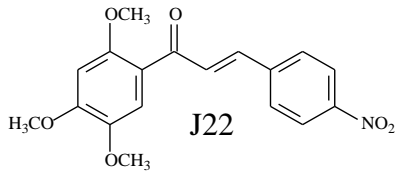
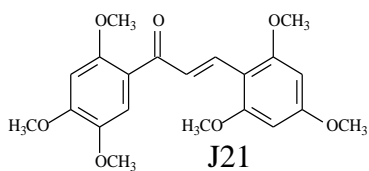
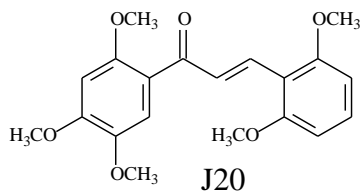
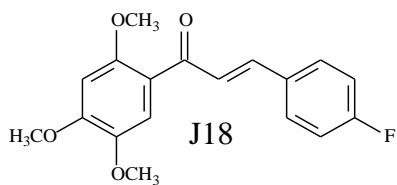
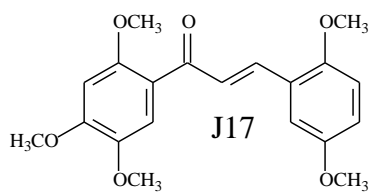
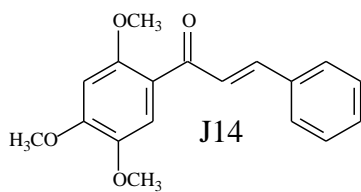
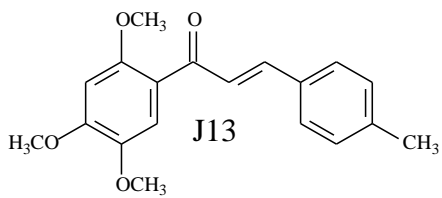
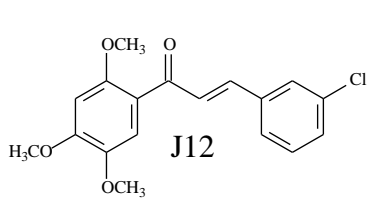
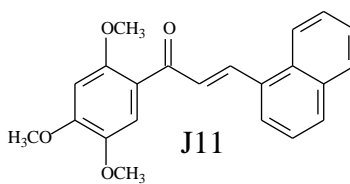
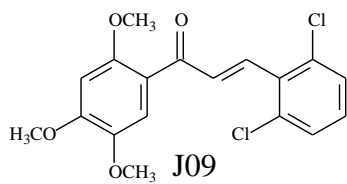
## APÊNDICE 2: CHALCONAS J: DERIVADAS DA 2,4,5- TRIMETOXIACETOFENONA

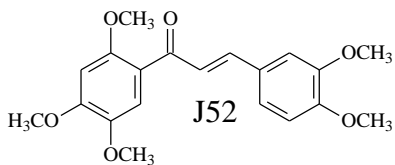
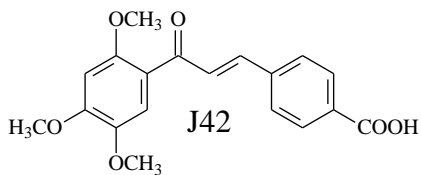
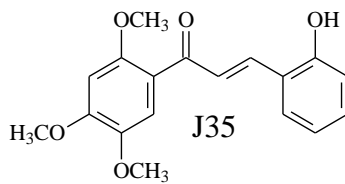
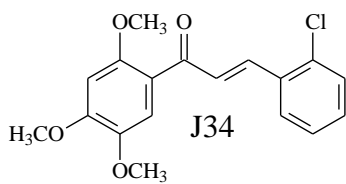
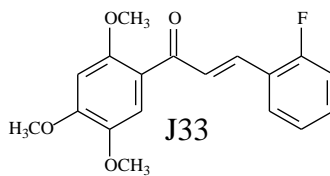
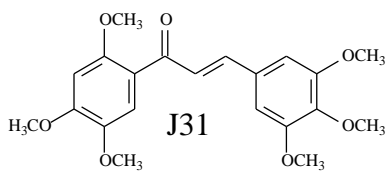
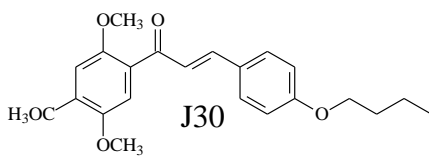
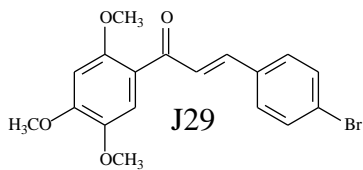
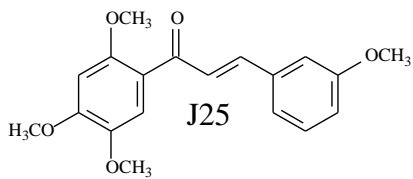
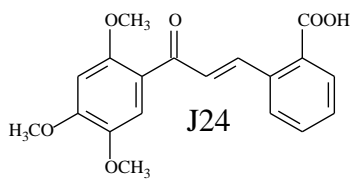
### 1. Reação básica de produção das chalconas da série J:



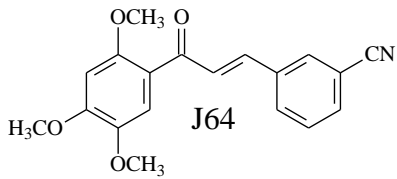
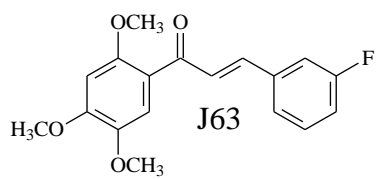
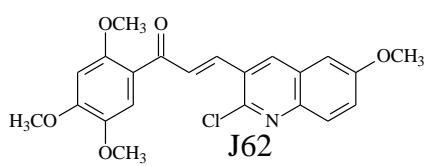
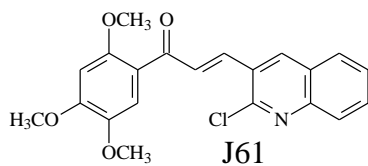
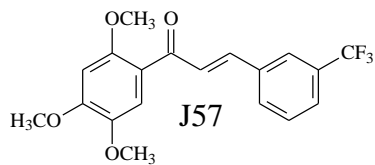
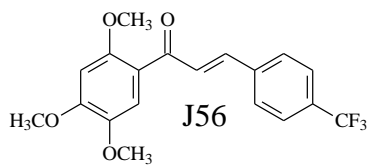
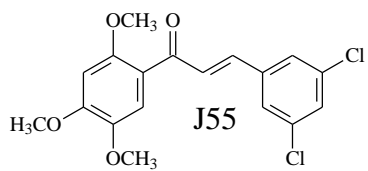
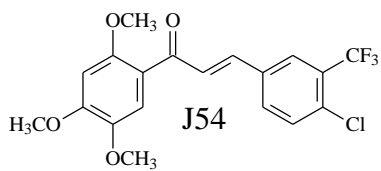
### 2. Estruturas das chalconas substituídas da série J:

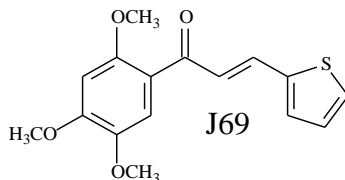
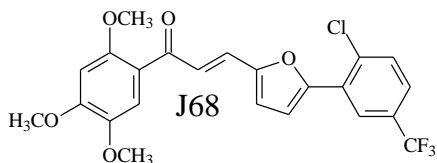
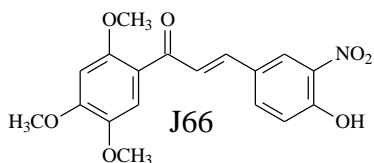












### 3. Nomenclatura das chalconas J, segundo IUPAC

J01: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (2,4,5-trimetoxifenil)-2-propen-1-ona

J03: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (1,3-benzodioxol-5-il) -2-propen-1-ona

J04: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (2-naftil) -2-propen-1-ona

J06: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3-(3,4-diclorofenil) -2-propen-1-ona

J07: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (4-metoxifenil) -2-propen-1-ona

J08: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (4-dimetilaminofenil) -2-propen-1-ona

J09: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (2,6 -diclorofenil) -2-propen-1-ona

J11: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (1-naftil) -2-propen-1-ona

J12: (2E) -1-(2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (cloro) -2-propen-1-ona

J13: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (4-metilfenil)-2-propen-1-ona

J14: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (fenil) - 2-propen-1-ona

J17: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (2,5-deimetoxifenil) - 2-propen-1-ona

J18A: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3-(4-fluorfenil) -2-propen-1-ona

J20: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (2,6-dimetoxifenil) -2-propen-1-ona

J21: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (2,4,6-trimetoxifenil) - 2-propen-1-ona

J22: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (4-nitrofenil) -2-propen-1-ona

J24: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (2-caboxifenil) -2-propen-1-ona

J25: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (3-metoxifenil) -2-propen-1-ona

J29: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (4-bromofenil) -2-propen-1-ona

J30: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (4- butoxifenil) -2-propen-1-ona

J31: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (3,4,5-trimetoxifenil) - 2-propen-1-ona

J33: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (2-fluorfenil) -2-propen-1-ona

J34: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (2-clorofenil) -2-propen-1-ona

J35: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (2-hidroxifenil) -2-propen-1-ona

J42: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (4-carboxifenil) -2-propen-1-ona

J52: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (3,4 -dimetoxifenil)-2-propen-1-ona

J54: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (3-trifluormetil-4-cloro-fenil) -2-propen-1-ona

J55: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (3,5-diclorofenil) -2-propen-1-ona

J56: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (4-trifluormetilfenil)-2-propen-1-ona

J57: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (3-trifluormetilfenil) -2-propen-1-ona

J61: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (2-cloroquinolin-3-il)-2-propen-ona

J62: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (2-cloro-6-metoxiquinolin-3-il) -2-propen-1-ona

J63: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (3-fluorfenil) -2-propen-1-ona

J65: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (3-cianofenil)-2-propen-1-ona

J66: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (3-nitro-4-idroxifenil)-2-propen-1-ona

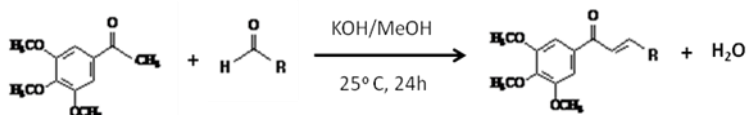
J68: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3- (5-(2-cloro-5-(trifluormetil)fenil)furan-2-il)-2-propen-1-ona

J69: (2E) -1- (2',4',5'-trimetoxifenil) -3-(tiofen-2-il) -2-propen-1-ona

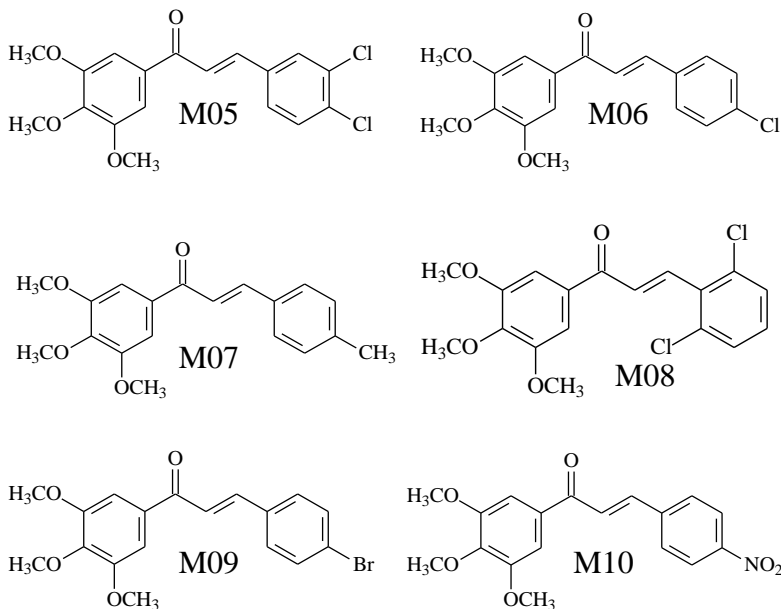
## APÊNDICE 3

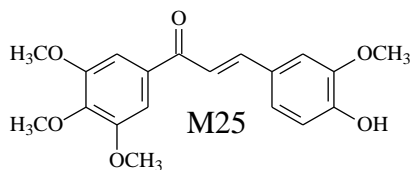
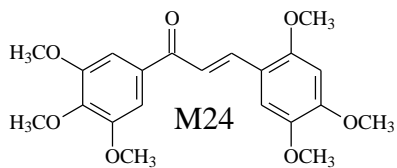
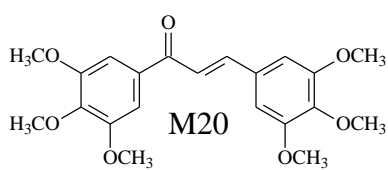
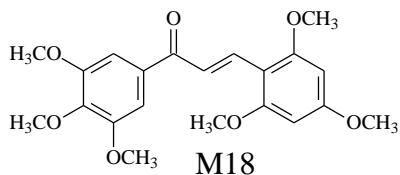
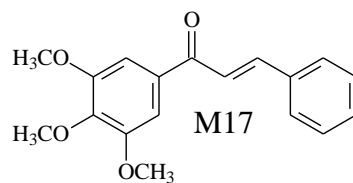
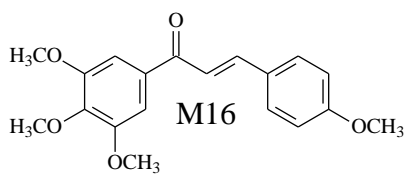
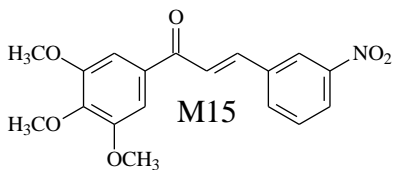
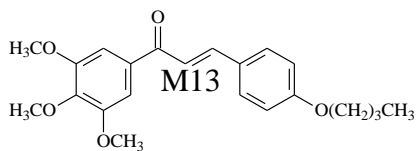
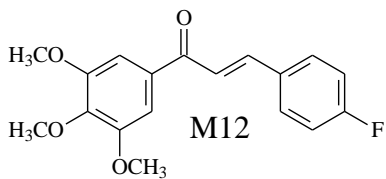
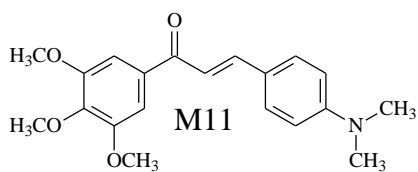
### CHALCONAS M: DERIVADAS DA 3,4,5-TRIMETOXIACETOFENONA

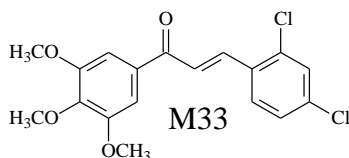
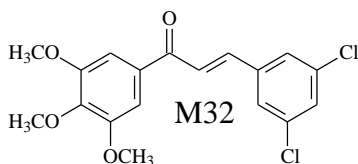
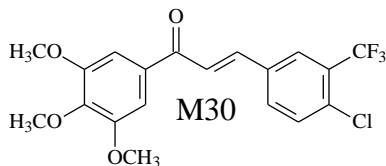
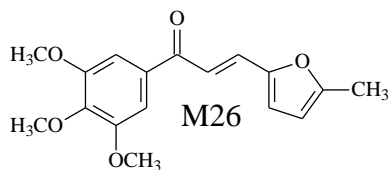
#### 1. Reação de produção das chalconas M:



#### 2. Estruturas das chalconas substituídas da série M:







### 3. Nomenclatura das chalconas M, Segundo IUPAC

M05: (2E) -1- (3',4',5'- trimetoxifenil)-3-(3,4-diclorofenil) -2-propen-1-ona

M06: (2E) -1- (3',4',5'- trimetoxifenil)-3-(4-clorofenil) -2-propen-1-ona

M07: (2E) -1- (3',4',5'- trimetoxifenil)-3-(4-metilfenil) -2-propen-1-ona

M08: (2E) -1- (3',4',5'- trimetoxifenil)-3-(2,6-diclorofenil)-2-propen-1-ona

M09: (2E) -1- (3',4',5'- trimetoxifenil)-3-(4-bromofenil)-2-propen-1-ona

M10: (2E) -1- (3',4',5'- trimetoxifenil)-3-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona

M11: (2E) -1- (3',4',5'- trimetoxifenil)-3-(4-dimetilamino)-2-propen-1-ona

M12: (2E) -1- (3',4',5'- trimetoxifenil)-3- (4-fluorfenil)-2-propen-1-ona

M13: (2E) -1- (3',4',5'- trimetoxifenil)-3- (4-butoxifenil)-2-propen-1-ona

M15: (2E) -1- (3',4',5'- trimetoxifenil)-3- (3-nitrofenil)-2-propen-1-ona

M16: (2E) -1- (3',4',5'- trimetoxifenil)-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona

M17: (2E) -1- (3',4',5'- trimetoxifenil)-3-fenil-2-propen-1-ona

M18: (2E) -1- (3',4',5'- trimetoxifenil)-3-(2,4,6-trimetoxifenil)-2-propen-1-ona

M20: (2E) -1- (3',4',5'- trimetoxifenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-propen-1-ona

M24: (2E) -1- (3',4',5'- trimetoxifenil)-3-(2,4,5-trimetoxifenil)-2-propen-1-ona

M25: (2E) -1- (3',4',5'- trimetoxifenil)-3-(3-metoxi-4-hidroxi-fenil)-2-propen-1-ona

M26: (2E) -1- (3',4',5'- trimetoxifenil)-3-(5-metilfuran-2-il)-2-propen-1-ona

M30: (2E) -1- (3',4',5'- trimetoxifenil)-3-(3-trifluormetil-4-cloro-fenil)-2-propen-1-ona

M32: (2E) -1- (3',4',5'- trimetoxifenil)-3-(3,5-diclorofenil)-2-propen-1-ona

M33: (2E) -1- (3',4',5'- trimetoxifenil)-3- (2,4-diclorofenil)-2-propen-1-ona